

**Identifizierung und Charakterisierung der  
NH<sub>2</sub>-terminalen Domäne der Molybdäncofaktor-Sulfurase ABA3  
aus *Arabidopsis thaliana* als Pyridoxalphosphat-abhängige  
L-Cystein-Desulfurase**

**Von der Fakultät für Lebenswissenschaften  
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina  
zu Braunschweig**

**zur Erlangung des Grades eines**

**Doktors der Naturwissenschaften**

**(Dr. rer. nat.)**

**genehmigte**

**D i s s e r t a t i o n**

**von Torsten Heidenreich  
aus Celle**

**1. Referent:           Professor Dr. Ralf-Rainer Mendel**  
**2. Referent:           Honorarprofessor Dr. Dirk Heinz**  
**eingereicht am:      14.05.2007**  
**mündliche Prüfung (Disputation) am:  18.07.2007**  
**Druckjahr 2007**

## **Vorveröffentlichungen der Dissertation**

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

### **Publikationen:**

Heidenreich, T., Wollers, S., Mendel, R.R., Bittner, F. Characterization of the NifS-like domain of ABA3 from *Arabidopsis thaliana* provides insight into the mechanism of molybdenum cofactor sulfuration. *J. Biol. Chem.* 280, 4213–4218, 2005

Wollers, S., Heidenreich, T., Zachmann, D., Kraft, C., Zhao, Y., Mendel, R.R, and Bittner, F. Molybdenum cofactor-binding by the C-terminal domain of the molybdenum cofactor sulfurase ABA3 is required for activation of aldehyde oxidase and xanthine dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* unter Revision

### **Tagungsbeiträge:**

Bittner, F., Bretthauer, M., Heidenreich, T. and Mendel R. R.: Functional co-evolution of NifS-like and Fe/S-containing proteins beyond Fe/S-cluster synthesis. (Poster), Conference on Fe/S-Proteins: Biogenesis, Structure, Function, Pathogenesis and Evolution, Marburg, 2002

Bittner, F., Heidenreich, T., Nowak K. und Mendel R. R.: Hat die cytoplasmatische Sulfurase ABA3 eine zweite Funktion als stressinduzierbares Regulatorprotein im Kern? (Vortrag), 16.Tagung Molekularbiologie der Pflanzen, Dabringhausen, 2003

Bittner, F., Heidenreich, T. and Mendel R. R.: The Molybdenum Cofactor Sulfurase ABA3 – A New Role for a NifS-like Enzyme. (Poster), Gordon Research Conference „Molybdenum and Tungsten Enzymes“, Oxford, 2003

Heidenreich, T., Wollers, S., Schulze, J., Nowak, K., Dean, D.R., Mendel, R.R., and Bittner, F.: The Arabidopsis Molybdenum Cofactor Sulfurase ABA3 is a two Domain Protein combining Characteristic of Iron-Sulfur-Cluster-Assembly Proteins and Chaperones. (Poster), Tagung der Deutschen Botanischen Gesellschaft, 2004

Bittner, F., Wollers, S., Heidenreich, T., Zarepour, M., Nowak, K., and Mendel, R.R.: ABA3 controls the activity of stress responsive proteins for ABA-synthesis and ROS-production. (Poster), 18.Tagung Molekularbiologie der Pflanzen, Dabringhausen, 2005

Bittner, F., Heidenreich, T., Wollers S., and Mendel, R.R.: Cytoplasmic Fe-S Proteins and Cysteine-Desulfurase Activity are essential for Biogenesis and Functioning of Molybdenum Enzymes in Plants. (Poster), 31st Steenbock Symposium "Fe-S Biogenesis: Biogenesis, Structure and Function", Madison/USA, 2005

Heidenreich, T., Wollers, S., Mendel, R.R., and Bittner, F.: Biochemical Characterisation of the NifS-like Domain of the Molybdenum Cofactor Sulfurase ABA3 from *Arabidopsis thaliana*. (Poster), Gordon Research Conference „Molybdenum and Tungsten Enzymes“, Oxford, 2005

---

## Inhaltsverzeichnis

<b>1.</b>	<b>Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1	Molybdän und seine Bedeutung in der Natur.....	1
1.2	Der Molybdän-Cofaktor .....	2
1.3	Die Struktur des Molybdän-Cofaktors .....	3
1.4	Die Biosynthese des Molybdän-Cofaktors .....	5
1.5	Monooxo-Mo-Hydroxylasen: Die Sulfurierung des Moco .....	8
1.6	Die Moco-Sulfurasen HMCS und ABA3 .....	10
1.7	Die L-Cystein-Desulfurasen der Eisen/Schwefel-Cluster-Biosynthese.....	12
1.8	Ziel der Arbeit.....	13
<b>2.</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>15</b>
2.1	Etablierte Methodik .....	15
2.1.1	Der Methylenblau-Aktivitätsassay .....	16
2.1.2	Der Silbersulfid-Aktivitätsassay .....	17
2.1.3	Der 1,5-I-AEDANS-In-Gel-Assay.....	18
2.1.4	Der Slot-Blot-Interaktionsassay .....	23
2.1.5	Das Protein/PLP-Absorptionsratio .....	25
2.2	Biochemische Charakterisierung von ABA3-NifS .....	26
2.2.1	Spektrale Eigenschaften von ABA3-NifS .....	27
2.2.2	Identifizierung des PLP-Cofaktors .....	28
2.2.2.1	Saturierung von ABA3-NifS mit PLP.....	29
2.2.3	Bestimmung des gebundenen Persulfids .....	30
2.2.4	Bestimmung des Moco/MPT-Gehaltes von ABA3-NifS .....	31
2.2.5	Die Aktivitäten von ABA3-NifS.....	32
2.2.5.1	Die L-Cystein-Desulfurase-Aktivität .....	32
2.2.5.2	Die Selenocystein-Lyase-Aktivität .....	34
2.2.5.3	Die Assemblierung von Eisen/Schwefel-Clustern <sup>36</sup>	
2.2.5.4	<i>In vitro</i> Aktivierung der Aldehydoxidase AO $\alpha$ .....	37
2.2.6	Interaktion zwischen ABA3-NifS und ABA3-CT .....	39
2.2.6.1	Slot-Blot-Analyse.....	41
2.2.6.2	Bandenshift im nativen Gel .....	42
2.2.6.3	Übertragung des Schwefels .....	42
2.2.6.4	Übertragung des Moco von ABA3-NifS auf ABA3-CT .....	46
2.2.7	Analyse von natürlichen Moco-Sulfurase-Mutanten.....	47

---

2.2.7.1	ABA3-NifS G469E .....	48
2.2.7.2	ABA3-NifS T301I .....	49
2.3	<i>In-vivo</i> -Analyse mit <i>A. thaliana</i> Pflanzenmaterial .....	51
2.3.1	Aktivitätsfärbung von <i>A. thaliana</i> -Rohextrakten .....	51
2.3.2	Der Vergleich von Wildtyp- mit Mutanten-Rohextrakten .....	52
2.3.2.1	Aktivitätsfärbung von gestresstem Material .....	53
2.4	Biochemische Erst-Charakterisierung von HMCS .....	55
2.4.1	Klonierung .....	55
2.4.1.1	Herstellung von HMCS-NifS C424A .....	57
2.4.2	Rekombinante Expression .....	57
2.4.2.1	Identifizierung von HMCS mittels Antikörper-Nachweis .....	58
2.4.3	Bestimmung der L-Cystein-Desulfurase-Aktivität von HMCS-NifS .....	58
2.4.3.1	Bestimmung des pH-Optimums .....	59
2.4.3.2	Bestimmung der optimalen Substrat-Konzentration .....	59
2.4.3.3	$K_m$ und $V_{max}$ von HMCS-NifS für L-Cystein .....	60
2.4.4	Biochemische Eigenschaften der HMCS-Konstrukte im Vergleich .....	61
2.4.4.1	Die L-Cystein-Desulfurase-Aktivität .....	62
2.4.4.2	Die L-Selenocystein-Lyase-Aktivität .....	63
<b>3.</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>65</b>
3.1	Nutzbarmachung des Schwefels für den Organismus .....	65
3.2	ABA3 im Kontext der L-Cystein-Desulfurasen .....	65
3.3	Die Analyse der einzelnen ABA3-Domänen .....	68
3.4	Methodik .....	69
3.4.1	Methylenblau-Aktivitätsassay .....	69
3.4.2	Silbersulfid-Aktivitätsassay .....	71
3.4.3	Slot-Blot-Interaktionsassay .....	72
3.5	Rekombinante Überexpression von ABA3-NifS .....	73
3.6	Biochemische Charakterisierung von ABA3-NifS .....	73
3.6.1	Die L-Cystein-Desulfurase-Aktivität .....	73
3.6.2	Die Selenocystein-Lyase-Aktivität .....	75
3.6.3	Der PLP-Cofaktor .....	75
3.6.4	Das Persulfid .....	76
3.6.5	Die beteiligten Cystein-Reste .....	77
3.6.6	Fe/S-Cluster Assemblierung .....	80
3.7	Die Interaktion der beiden ABA3-Domänen .....	81
3.8	Der Nachweis des nativen ABA3 in Pflanzenmaterial .....	84

---

3.9	Die Analyse natürlicher ABA3-Mutationen.....	86
3.10	Die Funktion von ABA3 <i>in vivo</i> .....	87
<b>4.</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>91</b>
4.1	Materialien .....	91
4.1.1	Verwendete <i>E. coli</i> - und <i>P. pastoris</i> Stämme .....	91
4.1.2	Plasmide .....	92
4.1.3	Expressionskonstrukte .....	92
4.1.4	Primer .....	93
4.1.5	Antikörper .....	94
4.1.6	Häufig verwendete Chemikalien, Enzyme und Matrices .....	95
4.1.7	Geräte, Materialien und Software .....	96
4.2.	Molekularbiologisches Arbeiten.....	98
4.2.1	Klonierungen.....	98
4.2.2	Polymerase-Kettenreaktion (PCR) .....	98
4.2.2.1	Klonierungs-PCR .....	99
4.2.2.2	Fusions-PCR.....	99
4.2.3	DNA-Sequenzierung .....	100
4.3	Arbeiten mit <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	100
4.3.1	Pflanzenanzucht .....	101
4.3.2	Ernte und Verarbeitung des Pflanzenmaterials .....	101
4.4	Proteinbiochemisches Arbeiten .....	102
4.4.1	Überexpression rekombinanter Proteine in <i>E. coli</i> .....	102
4.4.2	Überexpression rekombinanter Proteine in <i>P. pastoris</i> .....	103
4.4.2.1	Überexpression der AO $\alpha$ aus <i>A. thaliana</i> in <i>P. pastoris</i> .....	104
4.4.2.2	Proteinextraktion aus <i>P. pastoris</i> .....	105
4.4.3	Affinitätschromatographische Aufreinigung von His-getagten Proteinen.....	105
4.4.4	Bestimmung der Proteinkonzentration.....	106
4.4.5	Konzentrierung von Proteinlösungen.....	107
4.4.6	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	107
4.4.7	Native Polyacrylamid-Gelelektrophorese (native-PAGE) .....	108
4.4.8	Anionenaustauscher-Chromatographie .....	108
4.4.9	Gelfiltrations-Chromatographie.....	109
4.4.10	Umpuffern von Proteinlösungen .....	109
4.4.11	Western-Blot-Analyse .....	110
4.4.12	Antikörper-Aufreinigung.....	111
4.4.13	Slot-Blot-Interaktionsassay.....	112

---

4.4.14	L-Alanin-Assay .....	112
4.4.15	Methylenblau-Aktivitätsassay .....	113
4.4.16	AO-Aktivitätsassay im nativen Gel .....	114
4.4.17	Silbersulfid-Aktivitätsassay im nativen Gel .....	114
4.4.18	Fe/S-Cluster Assemblierung .....	115
4.4.19	MPT-Nachweis über FormA-dephospho .....	116
4.4.19.1	Probenvorbereitung.....	116
4.4.19.2	Isokratische Anionenaustauscher-Chromatographie .....	117
4.4.19.3	HPLC-Analyse von FormA-dephospho.....	117
4.4.20	Bestimmung des PLP-Gehaltes von Proteinen.....	117
4.4.21	1,5-I-AEDANS-In-Gel-Assay .....	118
4.4.22	Schwefelübertragung zwischen den ABA3-Domänen .....	118
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>120</b>
<b>6.</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>121</b>



## Abkürzungsverzeichnis

1,5-I-AEDANS	N-Iodoacetyl-N'-(5-sulfo-1-naphthyl)ethylendiamin	evtl.	eventuell
A	Adenin	FAD	Flavin-Adenin-Dinucleotid
aa	Aminosäuren	G	Guanosin
ABA	Abscisinsäure	H <sub>2</sub> S	Schwefelwasserstoff
Abb.	Abbildung	h	Stunde
amp	Ampicillin	IES	Indolessigsäure
AO	Aldehydoxidase	IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
ATP	Adenosintriphosphat	kan	Kanamycin
bp	Basenpaare	kb	Kilobasenpaare
bzw.	beziehungsweise	kDa	Kilodalton
C	Cytidin	Konz.	Konzentration
cDNA	komplementäre DNA	M	Mol (Konzentration)
CN <sup>-</sup>	Cyanid	max.	maximal
CTAB	Cethyltrimethyl-ammoniumbromid	min	Minute
dATP	desoxy-Adenosintriphosphat	mind.	mindestens
dCTP	desoxy-Cytidintriphosphat	mM	Millimolar
ddH <sub>2</sub> O	bidestilliertes Wasser	Mo	Molybdän
dest.	destilliert	Moco	Molybdän-Cofaktor
dGTP	desoxy-Guanosintriphosphat	MPT	Molybdopterin
DMPD	Dimethyl-p-phenylendiamin	mRNA	“messenger“-RNA
DMSO	Dimethylsulfoxid	μmol	Micromol
dNTP	desoxy-Nucleosidtriphosphat	NADH	Nicotinamid-adenin-dinucleotid (reduziert)
dTTP	desoxy-Tymintriphosphat	NaOH	Natriumhydroxid
DNase	Desoxyribonuclease	nm	Nano-Meter
DNA	Desoxyribonukleinsäure	NR	Nitratreduktase
DTT	Dithiothreitol	OD	optische Dichte
EDTA	Ethylendiamintetraacetat	PA	Polyacrylamid
EtOH	Ethanol	PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
		PCR	Polymerasekettenreaktion
		pmol	Picomol (Stoffmenge)
		PMS	Phenazinmethosulfat

PVDF	Polyvinylidon-Difluorid	<b>Abkürzungen für Artnamen</b>	
rif	Rifampicin		
RNA	Ribonucleinsäure	<i>A. nidulans</i>	<i>Aspergillus nidulans</i>
RNAse	Ribonuclease	<i>A. thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
upm	Umdrehungen pro Minute	<i>A. vinelandii</i>	<i>Azotobacter</i>
RT	Raumtemperatur		<i>vinelandii</i>
s	Sekunde	<i>B. taurus</i>	<i>Bos taurus</i>
SDS	Natrium-Dodecylsulfat	<i>D. melanogaster</i>	<i>Drosophila</i>
SO	Sulfitoxidase		<i>melanogaster</i>
T	Thymidin	<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
Tab.	Tabelle	<i>H. sapiens</i>	<i>Homo sapiens</i>
TE	Tris-EDTA-Puffer	<i>L. esculentum</i>	<i>Lycopersicon</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan		<i>esculentum</i>
U	“unit”, Einheit der Enzym-Aktivität	<i>N. plumbaginifolia</i>	<i>Nicotiana</i>
UE	Untereinheit	<i>N. tabacum</i>	<i>plumbaginifolia</i>
ÜN	Übernachtskultur	<i>P. pastoris</i>	<i>Nicotiana tabacum</i>
ü. N.	über Nacht		<i>Pichia pastoris</i>
UV-Licht	Ultraviolettes Licht		
V	Volt		
v:v	Volumen zu Volumen-Verhältnis		
Vol.	Volumen		
W	Watt		
WT	Wildtyp		
XDH	Xanthindehydrogenase		
XO	Xanthinoxidase		
XOR	Xanthinoxidoreduktase		

### ***Arabidopsis*-Ökotypen**

Col-0	Columbia
Le	Landsberg erecta
Ws	Wassilewskija

---

## Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1:	Der Molybdäncofaktor mit unterschiedlichen Liganden.....	4
Abb. 1.2:	Die Biosynthese des Moco.....	7
Abb. 1.3:	Die Sulfurierung des Moco .....	10
Abb. 1.4:	Die Molybdäncofaktor-Sulfurase ABA3 .....	12
Abb. 2.1:	Effizienz des H <sub>2</sub> S-Nachweis-Assays .....	17
Abb. 2.2:	Silberfärbung im nativen Gel .....	18
Abb. 2.3:	Persulfidnachweis mittels 1,5-I-AEDANS .....	19
Abb. 2.4:	Laufverhalten verschiedener 1,5-I-AEDANS-Reaktionsprodukte .....	21
Abb. 2.5:	Nachweis des Persulfids an ABA3-NifS .....	22
Abb. 2.6:	Schema des Slot-Blot-Interaktionsassays .....	24
Abb. 2.7:	Beispiel für Protein-Protein-Interaktion im Slot-Blot-Verfahren .....	25
Abb. 2.8:	Das Protein/PLP-Ratio .....	26
Abb. 2.9:	Spektrale Eigenschaften von ABA3-NifS.....	28
Abb. 2.10:	Vergleich der Anregungs- und Emissionsspektren von PLP und ABA3-NifS .....	29
Abb. 2.11:	K <sub>m</sub> -Wert von ABA3-NifS für L-Cystein .....	33
Abb. 2.12:	<i>In vitro</i> -Assemblierung von Fe/S-Clustern (nach P.C. Dos Santos, 2004) .....	36
Abb. 2.13:	AO-Aktivierung durch ABA3 und seine Domänen.....	38
Abb. 2.14:	AO-Aktivierung durch ABA3-NifS-Varianten .....	38
Abb. 2.15:	Dynamic Light Scattering .....	40
Abb. 2.16:	Interaktionsnachweis von ABA3-NifS mit ABA3-CT.....	41
Abb. 2.17:	Shift der Aktivitätsbande im nativen Gel .....	42
Abb. 2.18:	Persulfid-Beladung von ABA3-NifS und ABA3-CT.....	43
Abb. 2.19:	Fraktionsanalyse nach Gelfiltration .....	44
Abb. 2.20:	Schwefelübertragung von ABA3-NifS auf ABA3-CT .....	45
Abb. 2.21:	Sensitivität des Persulfid-Nachweises .....	46
Abb. 2.22:	L-Cystein-Desulfurase-Aktivität von ABA3-NifS G469E.....	48
Abb. 2.23:	Vergleich der Absorptionsspektren.....	49
Abb. 2.24:	L-Cystein-Desulfurase-Aktivität von ABA3-NifS T301I.....	50
Abb. 2.25:	Vergleich der Absorptionsspektren.....	50
Abb. 2.26:	L-Cystein-Desulfurase-Aktivität in <i>A. thaliana</i> -Rohextrakt.....	51
Abb. 2.27:	Aktivitätsfärbung mit L-Selenocystein und L-Cystein als Substrate im Vergleich .....	52
Abb. 2.28:	L-Cystein-Desulfurase-Aktivität in <i>aba3</i> -Mutanten.....	53
Abb. 2.29:	L-Cystein-Desulfurase-Aktivität in gestressten <i>aba3</i> -Mutanten.....	53

---

Abb. 2.30: Gesamt-L-Cystein-Desulfurase-Aktivität in Pflanzenrohextrakten.....	54
Abb. 2.31: Kontrolle der Teilfragmente vor und nach Fusions-PCR.....	56
Abb. 2.32: Kontrollgel der PCR von <i>hmcs-nifS</i> + <i>Linker</i> .....	56
Abb. 2.33: Nachweis von HMCS-NifS im Western-Blot .....	58
Abb. 2.34: Ermittlung des pH-Optimums für HMCS-NifS .....	59
Abb. 2.35: Ermittlung der optimalen Substrat-Konzentration für HMCS-NifS .....	60
Abb. 2.36: Darstellung der L-Cystein-Desulfurase-Aktivität nach Lineweaver Burk .....	61
Abb. 2.37: L-Cystein-Desulfurase-Aktivität der HMCS-Proteine .....	62
Abb. 2.38: L-Cystein-Desulfurase-Aktivität von HMCS im nativen Gel.....	63
Abb. 2.39: L-Selenocystein-Lyase-Aktivität von HMCS .....	64
Abb. 3.1: Schwefelverbindungen, welche von einem Persulfid-Schwefel als Schwefelquelle abhängig sind (modifiziert nach Kessler, 2006) .....	67
Abb. 3.2: Phylogenetische Gruppierung der NifS-Proteine .....	67
Abb. 3.3: Spektrale Charakteristika von PLP und ABA3-NifS .....	76
Abb. 3.4: Modell des putativen Loops der verschiedenen ABA3-Proteinvarianten.....	79
Abb. 3.5: Modell zum Mechanismus der Moco-Sulfurierung .....	83
Abb. 3.6: Spaltung von ABA3 in <i>E. coli</i> .....	88

## Tabellenverzeichnis

Tab. 2.1:	Saturierung von ABA3-NifS mit PLP .....	30
Tab. 2.2:	Nachweis eines Persulfids .....	31
Tab. 2.3:	L-Cystein-Desulfurase-Aktivität der ABA3-NifS Varianten .....	34
Tab. 2.4:	L-Selenocystein-Lyase-Aktivität der ABA3-NifS Varianten .....	35
Tab. 2.5:	Bereitstellung des Schwefels für die Fe/S-Cluster-Synthese .....	37
Tab. 4.1:	Verwendete <i>E. coli</i> - und <i>P. pastoris</i> Stämme .....	91
Tab. 4.2:	Plasmide .....	92
Tab. 4.3:	Expressionskonstrukte .....	92
Tab. 4.4:	Primer .....	93
Tab. 4.5:	Verwendete Antikörper .....	94
Tab. 4.6:	Häufig verwendete Chemikalien, Enzyme und Matrices .....	95
Tab. 4.7:	Geräte .....	96
Tab. 4.8:	Material .....	97
Tab. 4.9:	Software .....	97

# 1. Einleitung

## 1.1 Molybdän und seine Bedeutung in der Natur

Molybdän (Mo) ist ein ubiquitär vorkommendes Übergangsmetall der VI. Nebengruppe und als Spurenelement von essentieller Bedeutung für den Stoffwechsel nahezu aller bislang untersuchten Organismen. Das Mo ist dabei Bestandteil so genannter Mo-Enzymen, von denen bis heute mehr als 50 entdeckt wurden. Zur Klassifizierung wurden sie in verschiedene Familien eingeteilt (Hille, 1996a; Hille, 1996b; Kisker *et al.*, 1997). Der Großteil dieser Enzyme, welche das Mo für verschiedenste Oxidations- und Reduktionsreaktionen benötigen, sind prokaryontischen Ursprungs. Für Eukaryonten konnten bis vor kurzem sechs Mo-Enzyme beschrieben werden. Dabei handelt es sich um die Nitratreduktase (NR), Xanthinoxidoreduktase (XOR), Aldehydoxidase (AO), Sulfitoxidase (SO), Pyridoxaloxidase (PO) und Nicotinathydroxylase (NH) (Mendel und Bittner, 2006). Die NR erfüllt ihre Funktion bei der anorganischen Nitrataassimilation bei Pflanzen, Pilzen, Algen und einigen Bakterien. Die XOR kann in ihrer Xanthin-Dehydrogenase-Form (XDH) vorliegen und ist dann am Purinkatabolismus beteiligt und in Säugern ein wichtiges Strukturprotein bei der Sekretion von Milch. In der Xanthin-Oxidase-Form (XO) ist sie eines der Schlüssel-Enzyme zur Generierung von Sauerstoff-Radikalen. Die AO ist wichtig bei der Verstoffwechselung einer Vielzahl aromatischer und nichtaromatischer Heterozyklen sowie Aldehyde. Für die pflanzliche AO konnte eine Beteiligung an der Synthese von Abscisinsäure (Walker-Simmons *et al.*, 1989; Taylor, 1991; Seo *et al.*, 2000a), sowie mit *in vitro*-Assays die Umwandlung von Indol-3-Acetaldehyd zu Indoleessigsäure (Koshiba *et al.*, 1996) gezeigt werden. Die SO spielt eine Rolle bei der Sulfit-Detoxifizierung. Die Enzyme PO und NH wurden bislang nur in *Drosophila melanogaster* bzw. *Aspergillus nidulans* nachgewiesen. Hinzu kommt als siebtes Enzym die erst kürzlich entdeckte Benzamidoxim-Reduktase aus der äußeren Membran von Schweineleber-Mitochondrien. Sie katalysiert die Mo-abhängige N-Reduktion von Amidoximen zu Amidinen (Havemeyer *et al.*, 2006). Die funktionelle Vielseitigkeit dieser Enzyme unterstreicht die Wichtigkeit des Mo für den Stoffwechsel fast aller Organismen.

Die Anfänge der Erforschung des Mo liegen weit zurück und resultierten aus dessen Bedeutung für das gesunde Wachstum von Pflanzen (zusammengefasst durch Coughlan, 1980) und Mikroorganismen (Bartels, 1930). So wurden besonders in der Landwirtschaft Mo-Mangelerscheinungen bei Nutzpflanzen beobachtet (zusammengefasst durch Gupta, 1997). Als direkte Folge des Mangels konnte hier der Verlust der für Pflanzen essentiellen NR-Aktivität festgestellt werden. Bei Tieren konnte erstmals 1953 durch Reichert und Westerfeld

die Wichtigkeit des Mo gezeigt werden, indem sie die Bindung von Mo an das Enzym XO aus Leber und Magen von Ratten zeigten. Diese Entdeckung lieferte den ersten Hinweis auf eine direkte Assoziation von Mo mit einem Enzym. Kurz darauf folgte die Charakterisierung weiterer Enzyme, wie der tierischen AO (Mahler *et al.*, 1954) und der NR aus *Neurospora crassa* (Nicholas *et al.*, 1954), welche die Mo-Abhängigkeit dieser Enzyme zeigte. Schließlich konnten Cohen *et al.* (1971) die Wichtigkeit des Mo auch für den Menschen anhand der Beschreibung der SO als Mo-abhängiges Enzym belegen. Obwohl die Bedeutung des Mo für Pro- und Eukaryonten somit schon früh erkannt wurde, blieb die Natur seiner biologisch aktiven Form lange unerforscht.

## 1.2 Der Molybdän-Cofaktor

Mit der Charakterisierung verschiedener NR-Mutanten von *Aspergillus nidulans* wurde der Grundstein für die Erforschung des Mo-Metabolismus gelegt. Cove und Pateman (1963) untersuchten sechs Mutanten dieses Pilzes, wovon sich fünf dadurch auszeichneten, dass neben der NR-Aktivität auch die Aktivität der XDH verloren gegangen war. Beide Enzyme wiesen neben sehr verschiedenen katalytischen Funktionen nur das gebundene Mo als Gemeinsamkeit auf. Daraus schlossen Pateman *et al.* (1964) auf die Existenz eines gemeinsamen Molybdän-Cofaktors (Moco), dessen Synthese in den Mutanten defekt ist. Die an der Synthese beteiligten Genloci wurden identifiziert und mit dem Namen „*cnx*“ für „*c*ofactor for *n*itrate reductase and *x*anthine dehydrogenase“ bezeichnet. Für Pflanzen wurde diese Nomenklatur übernommen, wohingegen die bakteriellen Loci mit „*moa*, *mob*, *mod*, *moe*, *mog*“ bezeichnet wurden. Für Säuger etablierte sich die Bezeichnung „*mocs*“ (*m*olybdenum *c*ofactor *s*ynthesis). Einen wichtigen Beitrag zum Verständnis leisteten Nason *et al.* (1971) als sie zeigen konnten, dass der Moco nicht nur innerhalb der Molybdoenzyme eines Organismus, sondern auch organismenübergreifend austauschbar ist. So gelang es ihnen, inaktives NR-Apoprotein aus der *Neurospora crassa nit-1*-Mutante durch die Zugabe tierischer, pflanzlicher sowie bakterieller Moco-haltiger Extrakte zu komplementieren und aktives Holoenzym zu erzeugen. Basierend auf diesen Ergebnissen konnte auf eine universelle Struktur, eine konservierte Funktion und die ubiquitäre Verbreitung des Mocos geschlossen werden. Eine Ausnahme bildet hier die Nitrogenase. Dieses Mo-haltige Enzym war als einziges nicht in der Lage, den *nit-1*-Extrakt zu komplementieren. Pienkos *et al.* (1977) schlossen daher auf eine abweichende Struktur der Mo-Komponente dieses Enzyms. Wenig später konnte gezeigt werden, dass die Nitrogenase über einen einzigartigen Cofaktor verfügt. In diesem wird das Mo über ein Homocitrat als so genannter Fe-Moco komplexiert (Shah & Brill, 1977).

### 1.3 Die Struktur des Molybdän-Cofaktors

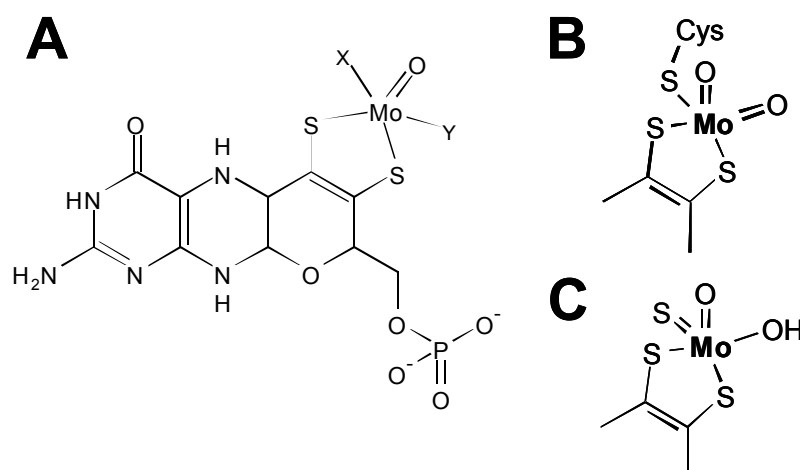
Nachdem die Existenz eines Organismen-übergreifend konservierten Cofaktors als biologisch wirksame Form des Mo angenommen wurde, sollte nun dessen Struktur aufgeklärt werden. Der Moco zeichnet sich jedoch durch eine Eigenschaft aus, welche die Analyse unter normalen Arbeitsbedingungen im Labor sehr erschwert. Er ist ausgesprochen sensitiv gegenüber Sauerstoff, was unter aeroben Bedingungen zu einer Halbwertszeit von wenigen Minuten führt. So fanden erste Versuche der Strukturaufklärung gezwungenermaßen an stabileren Degradations- bzw. Oxidationsprodukten statt. Die Analyse des Moco von XDH, SO und NR durch Johnson *et al.* (1980) enthüllte dabei ein bislang unbekanntes Pterin als organische, strukturgebende Komponente des Cofaktors. Ein Kaliumpermanganat-Oxidationsprodukt (Pterin-6-Carboxylsäure) ließ darauf aufbauend den Schluss zu, dass der aktive Cofaktor als 6-Alkylpterin vorliegen muss. Die Analyse weiterer spezifischer Oxidationsprodukte, welche allgemein hin als FormA nach Oxidation mit saurer I<sub>2</sub>/KI-Lösung und als FormB nach O<sub>2</sub>-Oxidation bezeichnet werden, zeigte eine aus vier C-Atomen bestehende Seitenkette mit einem terminalen Phosphatester am C6-Atom des Pterins (Johnson *et al.*, 1984). Des Weiteren konnten strukturelle Ähnlichkeiten zwischen FormB und dem natürlichen Metaboliten Urothion festgestellt werden, was auf das Vorhandensein von Schwefelgruppen im Moco hindeutete (Johnson *et al.*, 1982). Untermuert wurde diese Annahme durch die Sensitivität des Moco gegenüber Sulfhydrylreagenzien und die Stabilisierung in Gegenwart von reduzierenden Agenzien (Alikulov & Mendel, 1984). Die Behandlung des Moco mit thiolpezifischem alkylierendem Iodoacetamid und anschließende strukturelle Charakterisierung zeigten die Präsenz von zwei Thiolen am C1- und C2-Atom der Seitenkette unter Bildung einer Dithiolengruppe (Kramer *et al.*, 1987).

Basierend auf diesen Daten wurde ein Modell erstellt, nach welchem das Mo-Atom über die Dithiolengruppe an eine bitykliche 5,6,7,8-Tetrahydropterin-Komponente assembliert vorliegt und dabei zwei weitere Liganden an der Koordinierung des Mo-Atoms beteiligt sind (Kramer *et al.*, 1987). Die Mo-enthaltende, aktive Form des Cofaktors wird seitdem Moco genannt. Tatsächlich sind im Falle der Dioxo-Enzyme (z.B. NR und SO) zwei Oxo-Liganden und ein weiterer Cystein-Schwefel involviert (Abb. 1.1; A, B). Bei Monooxo-Enzymen wirken neben einer Hydroxygruppe ein Oxo- und ein Sulfo-Ligand als stabilisierende Gruppen (Abb. 1.1; A, C). Die Mo-freie und somit inaktive Form des Cofaktors bezeichnet man als Molybdopterin (MPT). Die endgültige Überprüfung der Richtigkeit der Struktur erfolgte erst 1995 durch Romao *et al.*, als die Kristallisierung des Molybdoenzyms Aldehydoxidoreduktase aus *Desulfovibrio gigas* gelang. Sie bestätigte fast komplett die bislang abgeleitete Struktur des Moco. Lediglich die Ausbildung eines Pyrano-Rings



zwischen dem C3-Atom der Seitenkette und dem C7-Atom des Pterins zu einem trizyklischen Ringsystem wurde bislang nicht erkannt. Spätere Strukturanalysen weiterer bakterieller Mo-Enzyme bestätigten die Natur des Moco als 5,6,7,8-Tetrahydro-Pyranopterin (Schindelin *et al.*, 1996; Boyington *et al.*, 1997). Die Aufgabe des Cofaktors ist die Positionierung des Redox-aktiven Mo im aktiven Zentrum, wobei das Pterin-Ringsystem vermutlich an dem Elektronen-Transfer von und zum Mo beteiligt ist.

Wie erwähnt, wurde, basierend auf den Ergebnissen der erfolgreichen *nit-1*-Rekonstitution mit eukaryontischen Extrakten, eine Organismen-übergreifend konservierte Struktur des Moco angenommen. Später konnten Johnson *et al.* (1990) jedoch zeigen, dass der eubakterielle Moco über eine Pyrophosphatbindung an das C4-Atom der Seitenkette ein Nukleotid assoziiert. Da die Grundstruktur des Moco dadurch jedoch unbeeinflusst bleibt, hat die Annahme einer konservierten Struktur weiterhin Bestand.



**Abb. 1.1:** **Der Molybdäncofaktor mit unterschiedlichen Liganden.** (A) Der Moco in Eukaryonten trägt am Mo-Atom neben dem doppelt gebundenen apikalen Sauerstoff zwei weitere Liganden (X: Cys-S- oder S=; Y: O= oder OH-). In Prokaryonten kann er mit einem Nucleosid-Monophosphat verestert sein. (B) Bei Dioxo-Mo-Enzymen trägt er zwei Oxo- und einen Cystein-Schwefel-Liganden. (C) In Monooxo-Enzymen hat das Mo neben einer Hydroxygruppe einen Oxo- sowie einen Sulfo-Liganden gebunden.

## 1.4 Die Biosynthese des Molybdän-Cofaktors

Der Moco ist essentiell für die Aktivität einer Vielzahl von Enzymen, welche sehr verschiedene Reaktionen in unterschiedlichen Stoffwechselwegen katalysieren. Er nimmt somit eine wichtige Stellung im Gesamtstoffwechsel des Organismus ein.

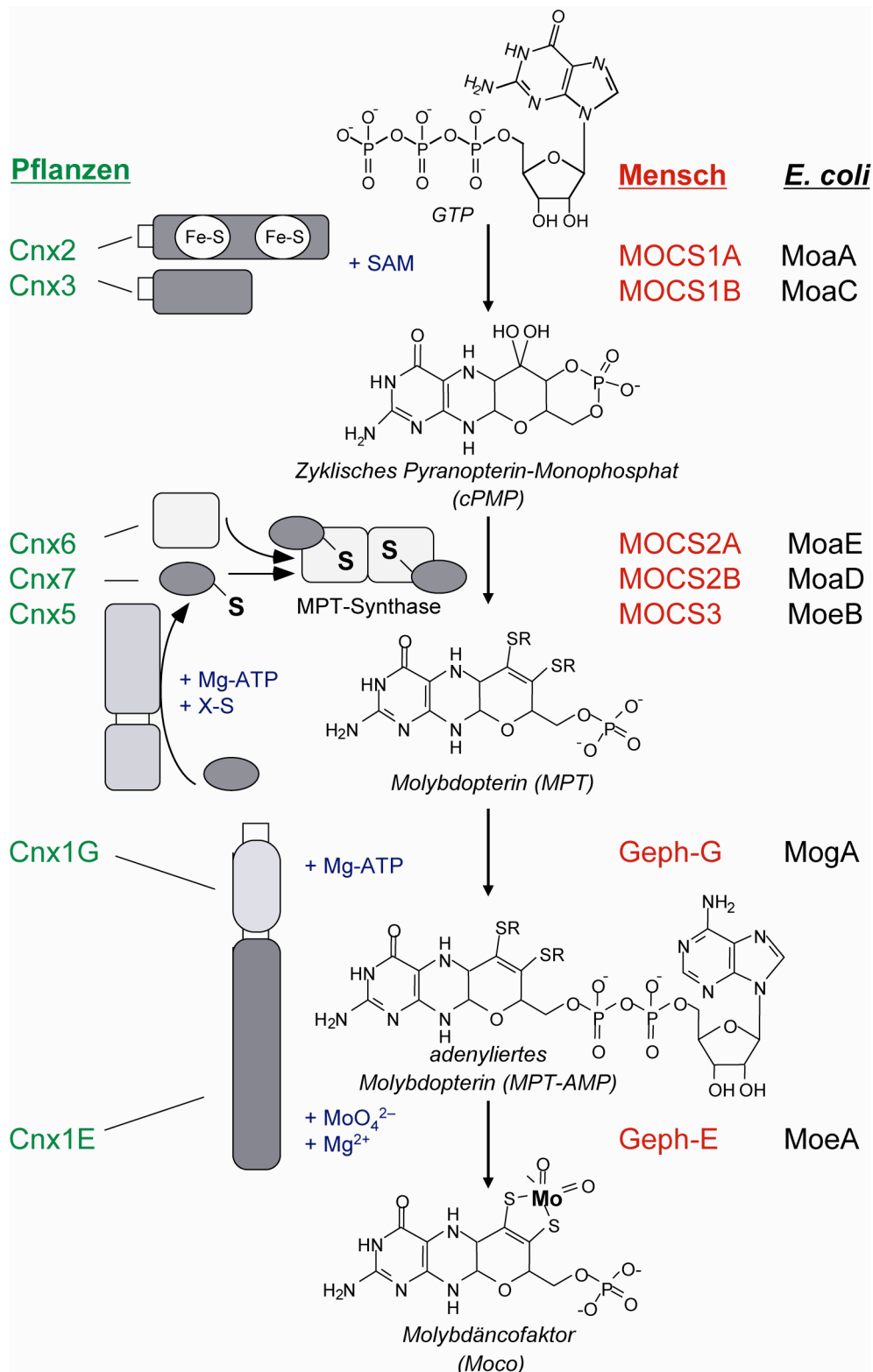
Ein Defekt in der Moco-Biosynthese hat für den Organismus gravierende Folgen, da simultan alle Moco-abhängigen Proteine ihre Aktivität verlieren. Dies hat in der Regel den Tod zur Folge. Für den Cofaktor selbst wurde schon früh die konservierte Struktur gezeigt. Daher nahm man an, dass auch die Synthese nach konservierten Mechanismen abläuft (Mendel, 1992). Erste Einsichten in die Biosynthese des Moco ergaben die fünf pleiotropen *cnx*-Mutanten aus *Aspergillus nidulans* (Pateman *et al.*, 1964). Den Durchbruch brachten jedoch entsprechende *E. coli*-Mutanten. Für insgesamt 15 Gene auf den 5 Mo-Operons konnte eine Beteiligung an der Moco-Biosynthese gezeigt werden (zusammengefasst durch Rajagopalan, 1992). Später konnte ein vollständiges Modell der Moco-Biosynthese auch auf Eukaryonten übertragen werden (Schwarz, 2005; Schwarz und Mendel, 2006). Die Einteilung der Biosynthese erfolgte dabei anhand der detektierbaren Intermediate in vier Schritten (Abb. 1.2).

Die Analyse von Mutanten ergab, dass zunächst Guanosintriphosphat (Hänzelmann *et al.*, 2004) durch Ringerweiterung in die schwefelfreie Pterinverbindung cPMP (zyklisches Pyranopterin-Monophosphat) umgewandelt wird (Schwarz & Mendel, 2006). Die Verwendung von radioaktiv markiertem GTP zeigte, dass alle radioaktiven C-Atome in die Struktur des cPMP eingebaut werden (Wuebbens & Rajagopalan, 1995). Massenspektrometrie und  $^1\text{H}$  NMR enthüllten später, dass cPMP bereits über ein vollständig reduziertes Tetrahydropterin-Gerüst verfügt und am C1-Atom durch Hydratisierung eine Diolgruppe trägt (Santamaria-Araujo *et al.*, 2004). In *E. coli* wird dieser Schritt durch die Enzyme MoaA und MoaC (Rivers *et al.*, 1993), in *A. thaliana* durch Cnx2 und Cnx3 (Hoff *et al.*, 1995) und im Menschen durch MOCS1A und MOCS1B (Reiss, 2000) katalysiert.

Der zweite Schritt beinhaltet die Umwandlung von cPMP zu MPT. Dies geschieht unter Ausbildung einer Dithiolengruppe durch Einfügen der beiden SH-Gruppen, sowie der Dezyklisierung der Phosphatgruppe (Pitterle & Rajagopalan, 1993; Pitterle *et al.*, 1993). Dieser Schritt wird durch die MPT-Synthase katalysiert. Hierbei handelt es sich um ein Heterotetramer, welches aus zwei grossen und zwei kleinen Untereinheiten besteht (Rudolph *et al.*, 2001). In *A. thaliana* wird sie von Cnx6 und Cnx7, in *H. sapiens* von MOCS2A und MOCS2B, in *E. coli* von MoaE und MoaD gebildet. Die kleine Untereinheit muss zunächst selbst adenyliert und sulfuriert werden, um den Schwefeltransfer auf das cPMP bewerkstelligen zu können. Dies geschieht in *E. coli* durch die Adenylase MoeB, und

eine bislang unbekannte Sulfurase (Leimkühler und Rajagopalan, 2001). In Eukaryonten werden vermutlich beide Reaktionen durch das Enzym Cnx5 (*A. thaliana*) und MOCS3 (*H. sapiens*) katalysiert (Matthies *et al.*, 2004 und 2005).

In zwei verknüpften Schritten wird abschließend das Mo in das MPT-Gerüst inkorporiert, um den fertigen Moco zu bilden. Kürzlich konnte für Pflanzen (*A. thaliana*) dieser Schritt genauer analysiert werden. Das Zwei-Domänen-Protein Cnx1 ist bekannt dafür, MPT fest zu binden und an dessen Umwandlung zu Moco beteiligt zu sein (Schwarz *et al.*, 2000). Kristallisationsstudien konnten nun zeigen, dass sich an der C-terminalen Domäne (Cnx1-G) ein neues Intermediat findet (Kuper *et al.*, 2004). Dabei handelt es sich um von Cnx1-G in Abhängigkeit von  $Mg^{2+}$  und ATP synthetisiertes adenyliertes MPT (MPT-AMP) (Llamas *et al.*, 2004). In einem nachfolgenden Schritt wird unter Hydrolyse des AMP durch die  $NH_2$ -terminale Domäne von Cnx1 (Cnx1-E) das Mo auf die Dithiolengruppe des MPT übertragen. In *H. sapiens* wird dieser Schritt durch das Cnx1-homologe Protein Gephyrin katalysiert (Stallmeyer *et al.*, 1995 und 1999, Schwarz *et al.*, 2000). Die *E. coli mogA*-Mutanten können durch die Zugabe hoher Molybdat-Konzentrationen teilweise restauriert werden. Daher nahm man früh an, dass das MogA-Protein an diesen letzten Schritten der Synthese beteiligt ist (Hinton & Dean, 1990; Rajagopalan 1996; Joshi *et al.*, 1996). Die Inkorporation des Mo selbst wird dabei durch das Protein MoeA vorgenommen. Der Moco befindet sich nun in der Form, wie er in vielen Mo-Enzymen seine biologische Funktion erfüllt. Im Fall bestimmter Organismen oder Enzyme sind aber weitere Modifikationen notwendig. In Eubakterien wird in einem durch das Protein MobA katalysierten Schritt an den Cofaktor ein Nukleotid assoziiert (Palmer *et al.*, 1994 und 1996) um die aktive Dinucleotid-Form des Moco (MGD) zu bilden. Einige Enzyme andererseits verlangen einen Modifikationsschritt nach der Inkorporation des Moco, um ihre Aktivität zu erhalten.



**Abb. 1.2:** Die Biosynthese des Moco. Von der Ausgangssubstanz GTP wird über die detektierbaren Intermediate cPMP, MPT und MPT-AMP der Molybdäncofaktor gebildet. Die beteiligten Enzyme sind für Pflanzen (grün), Mensch (rot) und *E. coli* (schwarz) angegeben.

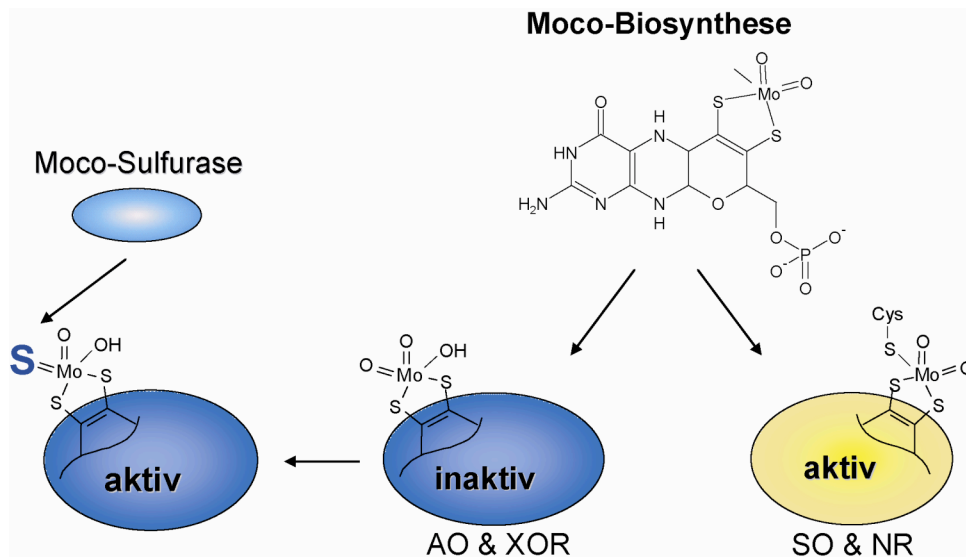
## 1.5 Monooxo-Mo-Hydroxylasen: Die Sulfurierung des Moco

Frühe Versuche durch Massey & Edmondson aus dem Jahre 1970 zeigten bereits lange vor der Beschreibung des Moco durch Johnson *et al.* im Jahre 1980, dass die Mo-Enzyme XO aus Kuhmilch sowie XOR und AO aus Hühnchenleber durch Cyanid ( $\text{CN}^-$ ) inaktiviert werden können. Diese Behandlung bewirkt die Entfernung eines Schwefels vom Protein und dessen Bindung in Form von Thiocyanat ( $\text{SCN}^-$ ). Die vergleichende Betrachtung der Mo-Enzyme ergab nun, dass die SO aus Hühnchenleber nicht unter Bildung von  $\text{SCN}^-$  durch Cyanid inaktivierbar ist (Coughlan 1980). Als Erklärung für den inaktivierenden Effekt von  $\text{CN}^-$  wurden zwei Modelle entwickelt. Entweder ein für die Aktivität essentieller, entweder als Persulfid oder als Cystein gebundener, cyanolisierbarer Schwefel ist im Fall von XOR und AO, nicht aber in Fall der SO gebunden. Zum anderen wurde vorgeschlagen, dass es sich bei dem Schwefel um einen Liganden des Moco handelt, welcher sich ebenfalls durch  $\text{CN}^-$  abspalten lässt. Wahl und Rajagopalan konnten 1982 zeigen, dass dieser Schwefel weder dem Apoprotein noch der Pterin-Komponente des Moco zuzuordnen ist. Sie zeigten weiterhin, dass zuvor inaktiviertes Protein durch die Zugabe von Dithionit und Sulfid wieder aktiviert werden kann. Mittels dieses Rekonstitutionsansatzes belegten sie die anorganische Natur des Schwefels, indem sie radioaktiv markiertes [ $^{35}\text{S}$ ] in die inaktive Desulfo-XOR einbauten, welche dadurch ihre Aktivität zurückerhielt. Dieser radioaktive Schwefel konnte durch die Behandlung mit SDS sowie Guanidiniumchlorid wieder entfernt werden. Um die nicht-kovalente Bindung des Schwefels zweifelsfrei zu zeigen, wurde ein Assay zur Detektion eines säurelabilen Schwefels angewandt. Dabei entstand ein spezifischer [ $^{35}\text{S}$ ]-Methylenblau-Komplex. Mit diesen Daten als Grundlage wurde eine Assoziation des Schwefels an das Mo-Atom vorgeschlagen. Zusätzliche Daten von Bordas *et al.* (1980) stützen diese These. Sie konnten mit Hilfe von EXAFS-Analysen (Extended X-Ray Absorption Fine Structure) zeigen, dass bei der XO aus Kuhmilch das Mo des aktiven Proteins durch ein terminales Sulfid, eine Oxo-Gruppe sowie zwei Cysteine ligandiert ist. Für das inaktive Protein gilt jedoch, dass der Sulfid-Ligand durch eine zweite Oxo-Gruppe ersetzt ist.

Über die Herkunft und Übertragung des Schwefel-Liganden konnten jedoch noch keine Aussagen gemacht werden. Zur Klärung dieser Fragen verhalf die *maroon-like* (*ma-l*) Mutante der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster*. Im Rahmen ihrer Charakterisierung konnte festgestellt werden, dass die namensgebende, kastanienbraune Augenfarbe auf das Fehlen des Roten Augenpigments Drosopterin, verursacht durch den Verlust jeglicher XDH-Aktivität, zurückzuführen ist. Weitere sichtbare Merkmale dieser Mutante sind verkürzte, aufgeblähte und unregelmäßige Malpighi-Gefäße, welche gelb-orangene Pteridin-Globuli enthalten (Schwinck, 1960). Biochemisch relevant ist neben der inaktiven XDH (Forrest *et*

*al.*, 1956; Glassman & Mitchell, 1959) auch der Verlust der Aktivitäten von AO (Courtright, 1967) und PO (Forrest *et al.*, 1961). Bei allen drei Enzymen handelt es sich um Monooxo-Mo-Hydroxylasen, für die der terminale Schwefel zur Erlangung der Aktivität essentiell ist. Im Gegensatz dazu zeigt das vierte in *Drosophila* vorkommende, schwefelfreie Dioxo-Mo-Enzym SO keine Beeinträchtigung der Aktivität (Bogart & Bernini, 1981). Warner und Finnerty zeigten 1981 mit Hilfe des *nit-1*-Rekonstitutionsassays, dass die *ma-l* Fliegen normale Mengen an Moco aufweisen. Die Synthese selbst ist also nicht betroffen. Basierend auf diesen Erkenntnissen konzentrierte man sich auf eine mögliche posttranslationelle Modifikation des Moco. Wahl *et al.* konnten 1982 zeigen, dass die Aktivitäten von XOR, AO und PO in *ma-l*-Extrakten durch Behandlung mit Dithionit und Sulfid wiederhergestellt werden können. Dadurch wurde klar, dass die Inkorporation des terminalen Schwefels in der *ma-l*-Mutante defekt, und zudem genetisch kontrolliert ist.

Aus *Aspergillus nidulans* ist eine Mutante bekannt, welche ähnliche Charakteristika aufweist. Es handelt sich dabei um die *hxB*-Mutante (hypoxanthin non-utilizer, gene B), die sich dadurch auszeichnet, dass sie nicht auf Hypoxanthin oder Nicotinat als alleiniger Stickstoffquelle wachsen kann. Der Grund dafür ist der Verlust der Aktivität der Monooxo-Mo-Enzyme XOR sowie NH (Scazzocchio, 1973; Scazzocchio *et al.*, 1973; Lewis *et al.*, 1978). Die zu den Dioxo-Mo-Enzymen gehörende NR ist in ihrer Aktivität jedoch nicht beeinträchtigt. Somit zeigen beide Mutanten, *ma-l* wie auch *hxB* einen simultanen Ausfall der Monooxo-Mo-Enzyme bei gleichzeitig unbeeinflussten Dioxo-Mo-Enzymen. Somit kann für den *ma-l*-locus wie auch den *hxB*-locus eine Beteiligung an der enzymatischen Inkorporierung des terminalen Schwefels angenommen werden. Bezogen auf ihre postulierte Funktion werden die Genprodukte beider Loci als Moco-Sulfurasen bezeichnet (Abb. 1.3). Es wurden Komplementations-Versuche mit heteroallelen *ma-l*- (Glassman & Pinkerton, 1960; Chovnick *et al.*, 1969) und *hxB*-Mutanten (Hartley, 1970) durchgeführt. Dass hierbei intragenische Komplementation erfolgreich war, liess die Vermutung zu, dass es sich bei den Moco-Sulfurasen um Proteine mit mehreren unabhängigen Domänen handelt (Amrani *et al.*, 2000). Weitere cDNAs von Moco-Sulfurasen konnten später isoliert werden. Dazu zählen *mcsu* aus Rind (Watanabe *et al.*, 2000), *hmcs* aus *H. sapiens* (Ichida *et al.*, 2001), *aba3* aus *A. thaliana* (Bittner *et al.*, 2001), *flacca* aus Tomate (Sagi *et al.*, 2002) und *og* aus *Bombyx mori* (Komoto *et al.*, 2003). Für Prokaryonten sind weder Moco-Sulfurase-Mutanten noch deren entsprechende Loci beschrieben. Dabei besitzen auch sie durchaus Monooxo-Mo-Enzyme wie z.B. Aldehydoxidoreduktase (*Desulfovibrio gigas*) oder die XDH (*Rhodobacter sp.*).



**Abb. 1.3:** Die Sulfurierung des Moco. Nach Inkorporation des synthetisierten Moco erhalten Dioxo-Mo-Enzyme (z.B. SO und NR) sofort ihre Aktivität. Monooxo-Mo-Enzyme (z.B. AO und XOR) bleiben zunächst inaktiv. Sie benötigen einen Sulfurierungsschritt, der von einer Moco-Sulfurase katalysiert wird, um ihre Aktivität zu erlangen.

## 1.6 Die Moco-Sulfurasen HMCS und ABA3

Beim Menschen entwickelt sich im Fall von Mutationen der Moco-Sulfurase (HMCS) das Krankheitsbild der so genannten Xanthinurie Typ II. Charakteristisch ist hier der simultane Ausfall der Enzymaktivitäten von XOR und AO, während die Aktivität der SO unbeeinflusst bleibt (Reiter *et al.*, 1990). Ausschlaggebend für die Ausbildung des Phänotyps ist hier der Verlust der XOR-Aktivität. Dieses Enzym katalysiert mit der Degradation von Hypoxanthin und Xanthin zu Harnsäure die letzten Schritte des Purin-Katabolismus. Homozygote Individuen akkumulieren Xanthin und in geringen Mengen auch Hypoxanthin anstelle von Harnsäure. Dieser Stoffwechseldefekt wird symptomatisch an einem stark reduzierten Harnsäuregehalt im Blutplasma und Urin, Xanthin-Steinen in den Nieren, Harnwegs-Infekten sowie akutem Nierenversagen erkennbar (Stone & Simmonds, 1991). Oftmals verläuft die Xanthinurie Typ II jedoch vollkommen asymptomatisch. Der Ausfall der AO, welche in Säugern an der Hydroxylierung mehrerer heterozyklischer Verbindungen beteiligt ist und die Oxidation von Retinal zu Retinolsäure katalysiert (Tomita *et al.*, 1993), scheint jedoch keine hervortretenden Symptome mit sich zu bringen. Eine weitere Aufgabe der AO sieht man in der Detoxifizierung von Xenobiotika (Beedham, 1985). Versuche mit Leber-Extrakten von Affen zeigten, dass die Behandlung mit dem AO-spezifischen Inhibitor Menadion dem Extrakt die Fähigkeit nimmt, bestimmte Drogen in weniger schädliche Substanzen umzuwandeln (Kitamura *et al.*, 2001).

Dasselbe Bild von inaktiven Monooxo-Mo-Enzymen bei gleichzeitig aktiven Dioxo-Mo-Enzymen zeigt sich auch bei Mutationen der pflanzlichen Moco-Sulfurase. Die Ausbildung des Phänotyps ist hier anders als bei den Säugern und vor allem auf den Verlust der AO-Aktivität zurückzuführen. Vergleichend betrachtet weisen die *aba1*-Mutante aus *Nicotiana glauca* (Parry *et al.*, 1991; Leydecker *et al.*, 1995), die *flacca*-Mutante aus *Lycopersicon esculentum* (Marin & Marion-Poll, 1997) sowie die *aba3*-Mutante aus *Arabidopsis thaliana* (Leon-Kloosterziel *et al.*, 1996; Schwartz *et al.*, 1997) einen ähnlichen Phänotyp auf. Die Stomataregulation ist gestört, die Pflanzen haben einen welkigen Habitus, eine verminderte Stresstoleranz und die Samenruhe ist verkürzt. Verursacht werden diese Symptome durch eine deutliche Reduktion des Pflanzenhormons Abscisinsäure (ABA), dessen letzter Biosyntheseschritt durch eine AO katalysiert wird. Mindestens fünf Isoformen des Enzyms AO kommen entwicklungspezifisch geregelt in der Pflanze vor. Alle von ihnen sind mit unterschiedlicher Effizienz in der Lage, Abscisinaldehyd zu ABA zu oxidieren. Untersuchungen an *aba3*-Mutanten zeigten nun, dass in diesen Mutanten keine detektierbare AO-Aktivität vorhanden ist. Die gerade unter Stressbedingungen benötigte AO-abhängige, „indirekte“ ABA-Synthese kann nicht mehr stattfinden (Leon-Kloosterziel *et al.*, 1996). Zwei alternative Stoffwechselwege zur ABA-Synthese sichern den Pflanzen jedoch das Überleben, da das völlige Fehlen von ABA den Tod der Pflanzen zur Folge hätte. Man spricht hierbei von dem „direkten“ Weg der ABA-Synthese sowie einem Nebenweg über die Intermediate Xanthoxin und Abscisinalkohol (Seo & Koshiba, 2002). Unter Stressbedingungen ist die Expression vieler Stressresistenz-vermittelnder Gene jedoch an eine Erhöhung des basalen ABA-Gehalt gekoppelt (Chandler & Robertson, 1994). Eine Anpassung an Stressbedingungen ist für die *aba3*-Mutante somit nicht möglich. Beobachtet werden konnte dies bei Moco-Sulfurase-Mutanten an dem Fehlen einer Kältetoleranz (Gilmour & Tomasho, 1991; Heino *et al.*, 1990) oder einer Austrocknungs-Resistenz (Vartanian *et al.*, 1994). Rohextrakte von *aba3*-Pflanzen konnten mit Dithionit und Sulfid restauriert werden und erhielten durch diese chemische Sulfurierung ihre AO-Aktivität und somit die Fähigkeit zur AO-abhängigen ABA-Synthese zurück (Schwartz *et al.*, 1997). Dies zeigt die Wichtigkeit der posttranslationalen Modifikation des Moco von AO bzw. XOR und des daran beteiligten ABA3-Proteins.

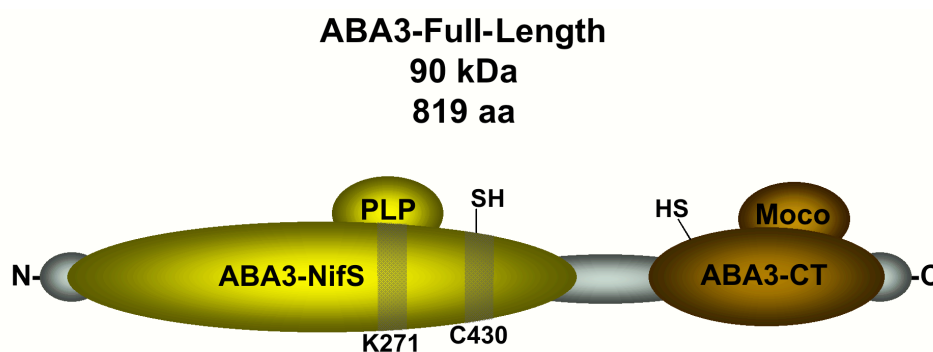
Bittner *et al.* konnten 2001 erstmals die putative Moco-Sulfurase ABA3 genetisch und biochemisch charakterisieren. Rekonstitutionsversuche in einem *in vitro*-System zeigten dabei, dass rekombinant exprimiertes ABA3 in der Lage ist, das Protein AO in Anwesenheit des Substrates L-Cystein direkt zu aktivieren. Die Analyse des Proteins zeigte eine Zwei-Domänen-Struktur, wobei die NH<sub>2</sub>-terminal gelegene Domäne (ABA3-NifS) signifikante Homologien zu NifS-ähnlichen Proteinen aufweist.



## 1.7 Die L-Cystein-Desulfurasen der Eisen/Schwefel-Cluster-Biosynthese

Die beobachteten Homologien zwischen NifS-Proteinen und ABA3-NifS gaben Anlass zu der Vermutung, dass zwischen diesen Proteinen strukturelle und funktionelle Ähnlichkeiten vorhanden sind. Die NifS-Proteine erfüllen ihre Funktion als L-Cystein-Desulfurasen größtenteils bei der Biosynthese von Eisen/Schwefel(Fe/S)-Clustern (zusammengefasst durch Mihara & Esaki, 2002). Ein wesentlicher Schritt zur Synthese von Fe/S-Clustern ist die Mobilisierung eines Schwefels und dessen Bereitstellung in einer aktivierten Form. Dieser Schritt beinhaltet die Umwandlung der schwefelhaltigen Aminosäure L-Cystein zu L-Alanin und einem gebundenen Persulfid-Schwefel. Dieses Persulfid stellt die aktivierte Form des Schwefels dar, welche direkt in die Fe/S-Cluster eingebaut werden kann. Die Mobilisierung des Schwefels erfolgt bei allen NifS-Proteinen nach konservierten Mechanismen.

Der Vergleich der Aminosäuresequenzen sowie der Eigenschaften der NifS-ähnlichen L-Cystein-Desulfurasen erlaubt die Einteilung in zwei Klassen (Mihara *et al.*, 1997). Die NifS/IscS-Proteine sind Enzyme des Typs I, während die SufS-Proteine zur Gruppe der Typ II-Enzyme zählen. Die L-Cystein-Desulfurasen beider Klassen besitzen ein konserviertes Motiv mit einem Lysin-Rest, welcher essentiell für die Bindung von Pyridoxalphosphat (PLP) als Cofaktor ist, sowie ein Persulfid-Bindemotiv (Zheng *et al.*, 1993; Zheng *et al.*, 1994; Kaiser *et al.*, 2000). Beide Motive finden sich auch bei ABA3-NifS wieder (Abb. 1.4). Der Vergleich der Aminosäuresequenzen zeigt, dass ABA3 mit den Enzymen des Typs II, den SufS-ähnlichen Proteinen gruppiert.



**Abb. 1.4: Die Molybdäncofaktor-Sulfurase ABA3.** Das Protein ABA3 unterteilt sich in eine NH<sub>2</sub>-terminal gelegene Domäne mit starken Homologien zu NifS-Proteinen und eine C-terminale, Moco-bindende Domäne bislang unbekannter Funktion. Die NifS-ähnliche Domäne enthält ein Motiv mit einem stark konservierten Lysin (K 271, Pyridoxalphosphat-Bindemotiv) und ein Motiv mit einem konservierten Cystein im aktiven Zentrum (C430, Persulfid-Bindemotiv). ABA3 liegt als Homodimer vor.

Auch ABA3 ist an der Mobilisierung und Übertragung eines Schwefels beteiligt, wie Bittner *et al.* 2001 zeigen konnten. Die zudem beobachteten Homologien von ABA3 mit NifS-Proteinen ließen daher die Vermutung zu, dass die Mechanismen zur Schwefelmobilisierung ähnlich ablaufen.

## 1.8 Ziel der Arbeit

Die grundsätzliche Funktion als pflanzliche Moco-Sulfurase in *A. thaliana* konnte für ABA3 bereits gezeigt werden (Bittner *et al.*, 2001). Dabei wurde ein Mechanismus für die Mobilisierung des Schwefels ähnlich dem von NifS-Proteinen vorgeschlagen. Über die genauen Zusammenhänge von Schwefel-Mobilisierung sowie -Übertragung konnte aber noch keine Aussage gemacht werden.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte schwerpunktmäßig der Reaktionsmechanismus der Schwefel-Mobilisierung detailliert untersucht und über die Analyse von mutagenisierten Protein-Varianten in seinen einzelnen Schritten verständlich werden. Dabei orientierten sich die Fragestellungen vorrangig an dem Wissen über NifS-Proteine. So sollte gezeigt werden, ob tatsächlich ein PLP als Cofaktor gebunden und an dem Mechanismus beteiligt ist. Die Rolle des konservierten Cystein-Restes im aktiven Zentrum und weiterer Cystein-Reste sollte ebenfalls geklärt werden.

Dafür wurde beabsichtigt, ABA3 in seine beiden einzelnen Domänen zu zerlegen, um diese unabhängig voneinander auf ihre spezifischen Funktionen hin untersuchen zu können. Zum anderen war aber gerade das Zusammenspiel der beiden Domänen von großem Interesse. So war zu klären, in welchem Umfang ABA3-NifS allein in der Lage ist, den Transfer des Schwefels auf die Zielproteine zu gewährleisten und in wie weit die C-terminale Domäne (ABA3-CT) an dem Mechanismus beteiligt ist. Für diese Domäne war bislang keine bestimmte Funktion bekannt. Es konnte lediglich gezeigt werden, dass sie *in vivo* für die Übertragung des Schwefels essentiell ist, wie z.B. die *flacca*-Mutation (Marin & Marion-Poll, 1997) aus der Tomate bestätigt. Theoretisch kam für ABA3-CT eine Funktion bei der Erkennung der Zielproteine in Frage. Basierend auf diesen Vorkenntnissen sollte der genaue Weg des Schwefels vom Substrat L-Cystein über ABA3-NifS und unter Beteiligung von ABA3-CT bis zum Zielprotein nachvollzogen werden.

Ein Grossteil der Experimente sollte an rekombinant exprimierten Proteinen durchgeführt werden. Doch gerade die *in vivo*-Situation war ebenfalls von großem Interesse. Es sollte gezeigt werden, in welchen Entwicklungsstadien der Pflanze ABA3 aktiv ist und ob das Enzym als vollständiges Protein oder in den einzelnen Domänen vorliegt. Da mit der

bestehenden Methodik das native ABA3 als Protein bislang nicht nachgewiesen werden konnte, war es notwendig, eine effektive und sensitive Methode zu entwickeln, mit der dieser Nachweis in Pflanzenrohextrakten gelingt.

Um das Verständnis der Moco-Sulfurierung auch auf den Menschen auszuweiten, war eine weitere Zielsetzung dieser Arbeit, neben ABA3 auch das humane Homolog HMCS erstmals funktionell zu charakterisieren. Dies machte ebenfalls die Klonierung sowie die rekombinante Expression des Proteins notwendig. Neben der Untersuchung des Wildtyp-Proteins wurde auch hier die Erstellung von Protein-Varianten angestrebt, deren Analyse helfen sollte, die Entstehung bestimmter Krankheitsbilder wie z.B. der Xanthinurie Typ II beim Menschen zu verstehen.

## 2. Ergebnisse

### 2.1 Etablierte Methodik

Um das Protein ABA3-NifS umfassend biochemisch charakterisieren zu können, mussten verschiedenste Methoden angewendet werden. Zum Teil konnte dabei auf gut etablierte Assays zurückgegriffen werden. Einige Fragestellungen machten aber die Verbesserung bestehender Methoden oder sogar die Entwicklung neuer Herangehensweisen nötig. Daher sollen in diesem Kapitel zunächst jene Assays vorgestellt werden, welche umfassend verändert, angepasst oder mit einer bestimmten Zielsetzung speziell entwickelt wurden.

Dabei ließen sich prinzipiell zwei Interessengebiete voneinander abgrenzen. Der eine Teil der Analytik befasste sich direkt mit dem Reaktionsmechanismus der Schwefelmobilisierung. Von Interesse waren dabei involvierte Cofaktoren, gebildete Intermediate sowie die Geschwindigkeit der Reaktion im Fall von Wildtyp-Protein und eigens dafür erstellten Protein-Varianten. Dieser Teil befasste sich ausschließlich mit der NifS-ähnlichen Domäne von ABA3 bzw. HMCS.

Im zweiten Interessengebiet sollte die physiologische Funktion von ABA3 analysiert werden. Dazu sollte zum einen die Interaktion von ABA3-NifS mit der C-terminalen ABA3-Domäne untersucht und gleichzeitig der weitere Weg des gebildeten Schwefels verfolgt werden. Zum anderen war die Charakterisierung des nativen ABA3-Proteins anhand seiner *in vivo*-Aktivität ein Ziel dieser Arbeit.

Für die Analyse der L-Cystein-Desulfurase-Aktivität wurde ein auf Fogo & Popowsky (1949) zurückgehender Assay zur Bestimmung von H<sub>2</sub>S so optimiert, dass die schnelle vergleichende und unter bestimmten Bedingungen auch quantitative Analyse eines proteingebundenen Persulfids möglich ist.

Ein für die Untersuchung der Aktivitäten von Rohextrakten geeigneter In-Gel-Assay musste komplett neu entwickelt werden (Silbersulfid-Aktivitätsassay).

Da es für einige Fragestellungen nicht nur wichtig war, ob ein Persulfid gebildet wird, sondern auch wo sich dieser Schwefel befindet, wurde der mit einfachen Mitteln durchzuführende und dabei sehr sensitive 1,5-I-AEDANS-In-Gel-Assay etabliert.

Eine neue Methode zur Untersuchung von Protein-Protein-Wechselwirkungen ist der Slot-Blot-Interaktionsassay. Diese Technik beruht zwar auf denselben Prinzipien wie die gängige Dot-Blot-Methode, erlaubt aber aufgrund des Aufbaus eine deutlich flexiblere und verlässlichere Handhabung.

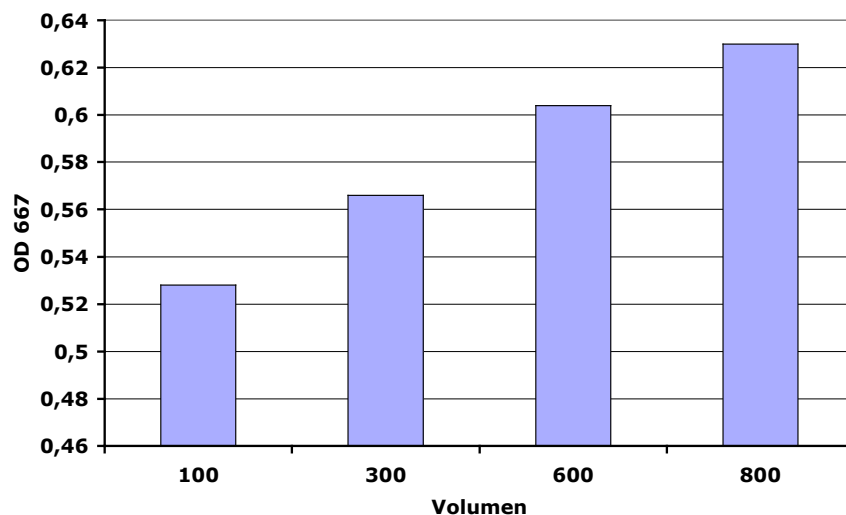
Einen wichtigen Beitrag zur schnellen Charakterisierung von Proteinen in Bezug auf die Saturierung mit PLP sollte eine einfache Messmethode gewährleisten (Protein/PLP-Absorptionsratio).

### 2.1.1 Der Methylenblau-Aktivitätsassay

In diesem Assay wird das durch ABA3-NifS gebildete Persulfid in einem fünfstufigen Prozess als Methylenblau nachgewiesen. Diese fünf Schritte unterteilen sich dabei in eine Phase der H<sub>2</sub>S-Synthese und eine anschließende Phase der Nachweisreaktion. Den ersten Schritt stellt die enzymatische Umsetzung des Substrates L-Cystein zu L-Alanin und Persulfid dar. In einem zweiten Schritt wird dieser Persulfid-Schwefel durch reduzierende Agenzien wie z.B. Dithiotreitol (DTT) abgespalten und als H<sub>2</sub>S freigesetzt. Das Enzym ist nun für einen weiteren Reaktionszyklus bereit. Beide Prozesse finden parallel in einer Lösung statt. Diese Inkubation wird so lange fortgesetzt, bis ausreichende Mengen an H<sub>2</sub>S produziert wurden.

Die Nachweis-Phase beginnt mit der Zugabe von Zinkacetat-Lösung, welche den H<sub>2</sub>S-Schwefel in Form von Zinksulfid bindet. Gleichzeitig wird dabei auch die Synthese-Reaktion gestoppt. Der Grund dafür ist, dass Zinkacetat leicht eine Verbindung sowohl mit dem vorhandenen DTT als auch mit L-Cystein eingeht und diese somit dem Reaktionsansatz schlagartig entzieht. In Verbindung mit dem gebildeten Zinksulfid formt dann DMPD zunächst Leukomethylenblau welches nach Zugabe von Fe<sup>3+</sup>-Ionen schließlich zu Methylenblau oxidiert wird. Dieses kann photometrisch bei 667 nm vermessen werden.

Die Messung des gebildeten H<sub>2</sub>S stellt eine schnelle und leicht zu handhabende Methode dar, um die L-Cystein-Desulfurase-Aktivität verschiedener Proteine zu vergleichen. Ein wesentlicher Faktor bei der Messung des H<sub>2</sub>S ist, dass es als leichtflüchtiges Gas dem Ansatz mit fortschreitender Inkubationszeit in steigendem Maße verloren geht. Versuche mit Reaktionsgefäßen, in denen der Reaktionsansatz mit verschiedenen großen Gasvolumen überschichtet war, zeigten eine deutliche Beziehung zwischen detektiertem H<sub>2</sub>S und Gasvolumen (Abb. 2.1). Dazu wurden 800 µl-Reaktionsgefäße mit 100-800 µl identischem Reaktionsmix (0,1 µg/µl Protein, 2 mM DTT, 0,5 mM L-Cystein) befüllt. Von jeder Probe wurden später 50 µl für die Färbung eingesetzt. Es zeigte sich eindeutig, dass die gemessene H<sub>2</sub>S-Menge mit der Verkleinerung der Gasphase zunimmt. Für kurze Inkubationszeiten unter 30 Minuten ist dieser Effekt nicht signifikant, da das H<sub>2</sub>S zunächst gut löslich ist. Um die Inkubationszeiten daher möglichst gering zu halten, wurde die optimale Synthese-Temperatur von 37°C ermittelt und die Probe kontinuierlich bei 180 rpm geschüttelt, was eine erhebliche Steigerung der Umsatzgeschwindigkeit mit sich brachte.



**Abb. 2.1:** **Effizienz des H<sub>2</sub>S-Nachweis-Assays.** Der Assay wurde in 800 µl-Reaktionsgefäßen durchgeführt. Das Probenvolumen variierte dabei zwischen 100 und 800 µl. Die Unterschiede in der Menge des nachgewiesenen H<sub>2</sub>S sind bereits nach einer Inkubationszeit von 1 Stunde bei 37°C gut zu erkennen. Mit Verringerung der Gasphase ist eine Erhöhung der H<sub>2</sub>S-Konzentration zu erkennen.

### 2.1.2 Der Silbersulfid-Aktivitätsassay

Im zuvor beschriebenen Assay wird das flüchtige Gas H<sub>2</sub>S gebunden und letztendlich über die Reaktion mit DMPD und Fe<sup>3+</sup>-Ionen als löslicher Farbstoff Methylenblau nachgewiesen. Er ist eine effiziente Methode, die Aktivität von L-Cystein-Desulfurasen in Lösung zu bestimmen und zu vergleichen. Bei dem Versuch, eine Mischung von Proteinen z. B. in einem Rohextrakt auf Aktivitätsebene zu untersuchen, ist diese Methode jedoch nur bedingt einsetzbar. Zwar ist es prinzipiell möglich, die Gesamtaktivitäten dieser Mischungen zu vergleichen, die Zuordnung der Aktivität zu bestimmten Proteinen ist aber unmöglich. Auch können niedermolekulare Bestandteile eines Extraktes die Färbung beeinflussen. Die Erstellung einer Referenz für diese Rohextrakte ist kaum möglich. Die Analyse solch einer Probe macht somit zunächst die Auftrennung der einzelnen Proteine notwendig, ohne jedoch deren native Konformation zu beeinträchtigen. Ein effektives Mittel hierzu ist die native Gelelektrophorese. Die Proteine werden in Banden separiert und können in ihrer nativen Konformation im Gel auf ihre Aktivität hin untersucht werden. Der Färbemechanismus des Methylenblau-Assays kann für die Analyse im Gel jedoch nicht angewendet werden. Das detektierte H<sub>2</sub>S ist ein leichtflüchtiges Gas, welches im Gel direkt bei der Bildung gebunden werden muss, da es sonst schnell entweicht. Das im Methylenblau-Assay verwendete

Zinkacetat bindet jedoch auch das DTT und L-Cystein, was zum sofortigen Synthesestopp führt. Des Weiteren ist der dabei gebildete lösliche Farbstoff aufgrund seiner Diffusion ungeeignet, um eine Bande im Gel zu formen. Es musste also ein alternativer Färbemechanismus auf der Basis eines unlöslichen Farbstoffs entwickelt werden.

Dabei bietet sich die Verwendung von Silbernitrat an, welches ebenfalls gut mit  $\text{H}_2\text{S}$  reagiert und das unlösliche, braun-schwarze Silbersulfid bildet. Diese Substanz kann optisch erfasst und somit zur Aktivitätsbestimmung von L-Cystein-Desulfurasen genutzt werden.

Die entwickelte Methode hat den großen Vorteil, dass das Protein während der Färbung seine native Konformation beibehält und das benötigte DTT sowie L-Cystein nicht bzw. nur sehr langsam mit dem Silbernitrat reagieren. Die Färbung kann somit über einen längeren Zeitraum bei andauernder Synthese stattfinden. Das gebildete  $\text{H}_2\text{S}$  wird durch das vorhandene Silbernitrat direkt am Entstehungsort gebunden, was letztlich zur Bildung einer Bande im Gel führt (Abb. 2.2). Die Färbelösung enthält das Substrat L-Cystein (10 mM), das zur Bildung des  $\text{H}_2\text{S}$  notwendige Reduktionsmittel DTT (10 mM) sowie Silbernitrat (10 mM). Der pH-Wert der Färbelösung wird auf ca. 10 eingestellt (100 mM Tris ungepuffert), da dann sowohl die  $\text{H}_2\text{S}$ -Synthese als auch die Färbereaktion effizient ablaufen. Die Färbung kann über den Zeitraum von mehreren Tagen erfolgen.



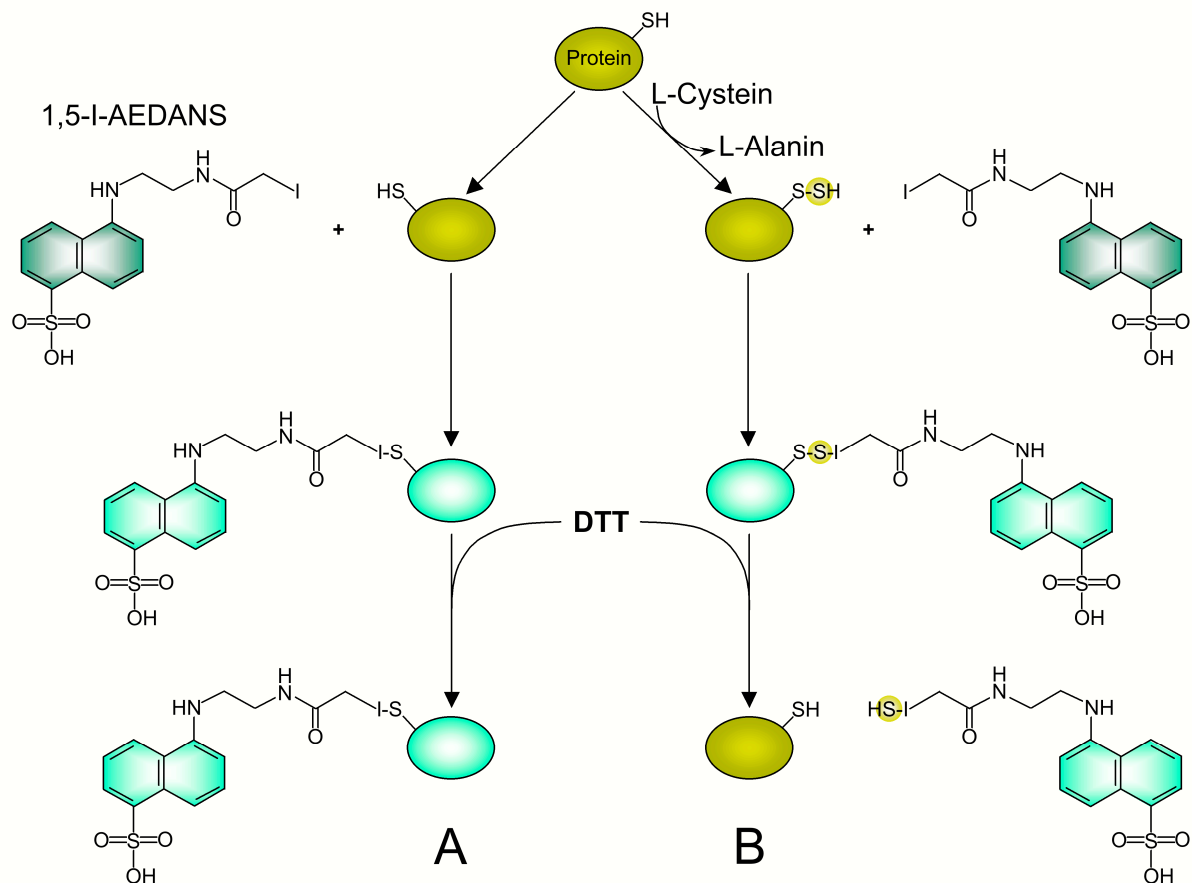
**Abb. 2.2:** Silberfärbung im nativen Gel. Die Aktivität von 50  $\mu\text{g}$  ABA3-NifS ist im nativen Gel gut zu bestimmen. Gefärbt wurde über Nacht bei Raumtemperatur in 100 mM Tris (ungepuffert) mit 10 mM DTT, 10 mM Cystein und 10 mM Silbernitrat.

### 2.1.3 Der 1,5-I-AEDANS-In-Gel-Assay

Für den Reaktionsmechanismus der L-Cystein-Desulfurierung bei NifS-ähnlichen Enzymen wurde die Bildung eines Persulfid-Intermediats an einem konservierten Cystein-Rest gezeigt (Zheng *et al.*, 1994). Unter Verwendung der Substanz N-Iodoacetyl-N'-(5-Sulfo-1-Naphthyl)

Ethylenediamine (1,5-I-AEDANS), die spezifisch mit Thiolgruppen reagiert, kann dieses Persulfid nachgewiesen werden (Abb. 2.3).

Prinzipiell kann die kovalente Bindung auch an die SH-Gruppe eines freien Cystein-Rests erfolgen. Das 1,5-I-AEDANS kann hierbei jedoch nicht wieder durch reduzierende Agenzien abgespalten werden (Abb. 2.3, A). An Persulfid gebundenes 1,5-I-AEDANS hingegen wird im reduzierenden Milieu und der damit verbundenen Spaltung von Disulfidbrücken vom Protein abgespalten (Abb. 2.3, B). Der Persulfid-Schwefel verbleibt dabei am 1,5-I-AEDANS. Die fluorochromen Eigenschaften des 1,5-I-AEDANS unter UV-Licht machen eine Vermessung dieser Fraktion möglich. In Vergleich zu freiem 1,5-I-AEDANS kann zudem eine deutliche Zunahme der Fluoreszenz beobachtet werden, wenn es in gebundener bzw. Schwefel-assoziiierter Form vorliegt. Die Farbe wechselt dabei von einem grünlichen Blauton zu strahlendem Türkis (Abb. 2.3).



**Abb. 2.3:** **Persulfidnachweis mittels 1,5-I-AEDANS.** Das Fluorochrom 1,5-I-AEDANS bindet an Cystein-Reste bzw. andere freie Thiolgruppen. (A) Erst einmal an Cystein-Reste gebunden, kann es nicht reduktiv abgespalten werden. Die Fluoreszenz verbleibt hierbei am Protein. (B) Ein über Persulfid-Schwefel gebundenes 1,5-I-AEDANS kann durch DTT abgespalten werden. Die Fluoreszenz befindet sich dann in der niedermolekularen Fraktion.



Ein Prinzip zur Markierung von Persulfiden war somit vorhanden. Eine optisch leicht zu erfassende Nachweisttechnik, welche sich auf die vergleichende Analyse vieler Proben anwenden lässt, fehlte jedoch bislang. Die Messung der Fluoreszenz machte die Verwendung spezieller und teurer Geräte notwendig. Unter Nutzung des für 1,5-I-AEDANS beschriebenen Reaktionsmechanismus sollte daher eine Nachweismethode entwickelt werden, mit der spezifisch das Reaktionsprodukt aus Persulfid und 1,5-I-AEDANS aus einer Proteinprobe isoliert und visualisiert werden kann.

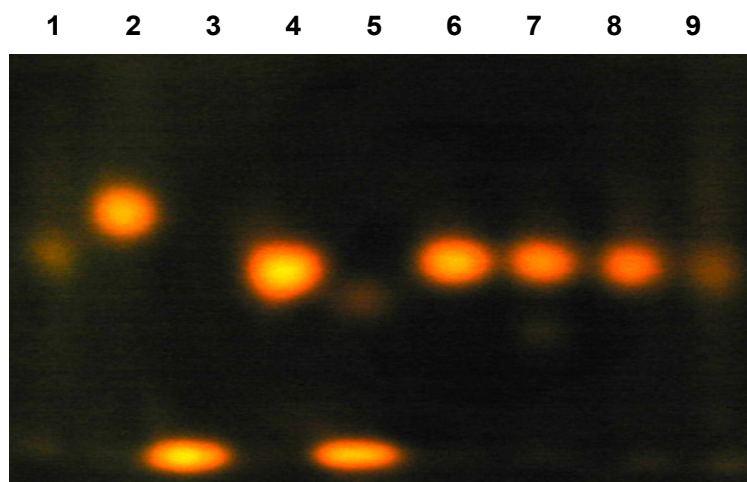
Eine wichtige Voraussetzung für diesen im Folgenden beschriebenen Assay ist die Entdeckung, dass sich 1,5-I-AEDANS bei der Elektrophorese in einem denaturierenden SDS-Polyacrylamid-Gel durch ein spezifisches Laufverhalten auszeichnet, welches sich durch die Reaktion mit verschiedenen Substanzen zum Teil deutlich manipulieren lässt. Dies gilt für das nachzuweisende Persulfid, aber auch für eine Vielzahl anderer Stoffe. Daher mussten zunächst alle potentiell im Assay vorkommenden Stoffe auf ihre Reaktivität mit 1,5-I-AEDANS und den damit verbundenen Einfluss auf dessen Laufverhalten hin untersucht werden. Die Aufgabe war es, die Auswahl der Substanzen sowie die Gellauf-Parameter so zu wählen, dass das Reaktionsprodukt aus Persulfid und 1,5-I-AEDANS später eindeutig im Gel bestimmt werden kann.

Zunächst wurde der Einfluss des pH-Wertes im Trenngel auf das Laufverhalten getestet. Dabei stellte sich heraus, dass eine Erniedrigung des pH-Wertes eine Verschlechterung, eine Erhöhung hingegen eine Verbesserung der Trennleistung mit sich brachte. Im Wesentlichen kann außerdem gesagt werden, dass ein hochprozentiges Gel die 1,5-I-AEDANS-Produkte schärfer auftrennt als ein niedrigprozentiges. Dies ist jedoch mit einer Stauchung der Proteinbanden verbunden.

In Abhängigkeit davon, ob auch die Proteinbanden untersucht werden sollten, wurden daher je nach Bedarf 12-20%ige SDS-Gele verwendet. Diese wurden in Abweichung vom Standardprotokoll durch die Zugabe von 140 µl 4M NaOH zu dem Gelmix auf einen pH von ca. 9,5 gebracht. In einem solchen Gel konnten zum einen verschiedene 1,5-I-AEDANS-Reaktionsprodukte effizient voneinander separiert werden, zum anderen befand sich die gesuchte Bande im mittleren Gelbereich.

Als Kontrollen wurden verschiedene Substanzen getestet, die über Thiolgruppen verfügen, sowie alle potentiell im Versuchsansatz vorkommenden Stoffe. Dies sollte gewährleisten, dass das Migrationsverhalten aller möglicherweise auftretenden Reaktionsprodukte bekannt ist. Diese zeigten dabei ein sehr unterschiedliches Laufverhalten (Abb. 2.4). Für die im Folgenden beschriebenen Proben wurden jeweils 0,5 nmol 1,5-I-AEDANS mit 100 nmol des potentiellen Reaktionspartners für 1 Stunde bei 22°C in 100 mM Natrium-Phosphat-Puffer, pH 8 inkubiert, bevor der Mix mit nativem Ladepuffer versetzt und mittels SDS-PAGE aufgetrennt wurde.

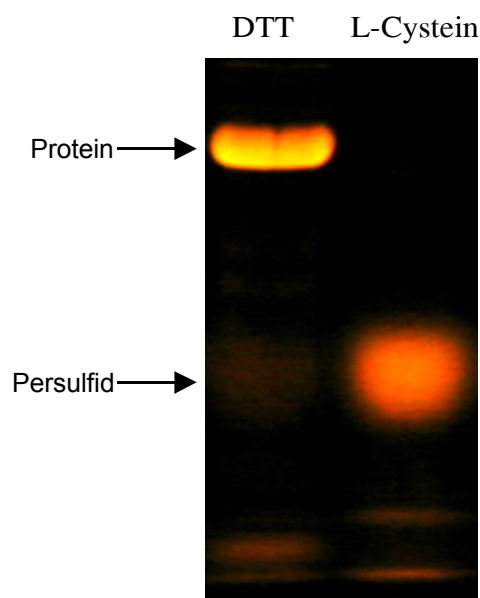
1,5-I-AEDANS selbst läuft verschmiert über die gesamte Spur mit einer schwachen Bande im mittleren Gelbereich (Abb. 2.4, Spur 1). Die Fluoreszenz ist relativ schwach. Als ein Reaktionspartner wurde L-Cystein getestet, da es als Substrat des Enzyms im Ansatz vorkommen kann. Das entstandene Produkt zeigt signifikant veränderte Eigenschaften. Die Bande findet sich nahe der Laufrfront wieder und die Fluoreszenz hat deutlich zugenommen (Abb. 2.4, Spur 3). Das bei dem Umsatz des Substrates entstehende L-Alanin hat keinen erkennbaren Einfluss (Abb. 2.4, Spur 9). DTT,  $\beta$ -Mercaptoethanol ( $\beta$ ME) und Tris-(2-cyanoethyl)-phosphine (TCEP) wurden getestet, da diese reduzierenden Agenzien zum Spalten der Disulfidbrücken in Frage kommen. Hier ist bei allen Proben ebenfalls eine deutliche Zunahme der Fluoreszenz zu beobachten. Während im Fall von DTT die Laufgeschwindigkeit verlangsamt wird (Abb. 2.4, Spur 2) formt sich bei  $\beta$ ME eine Bande im mittleren Gelbereich (Abb. 2.4, Spur 6) und TCEP beschleunigt das Laufverhalten ähnlich wie Cystein (Abb. 2.4, Spur 5). Der standardmäßig verwendete SDS-Ladepuffer enthält  $\beta$ ME und führt daher auch zu einem ähnlichen Reaktionsprodukt (Abb. 2.4, Spur 4). Interessanterweise sind hier aber im Vergleich zu reinem  $\beta$ ME leichte Unterschiede im Laufverhalten festzustellen. Das über Ni-NTA-Matrix aufgereinigte Protein enthält hohe Konzentrationen an Imidazol. Der Einfluss dieser Substanz ist in Spur 7 zu sehen. Auch hier bildet sich eine Bande im mittleren Gelbereich mit verstärkter Fluoreszenz. Unter Verwendung von  $\text{Na}_2\text{S}$  (Abb. 2.4, Spur 7) sollte ein Produkt hergestellt werden, welches mit jenem aus Persulfid und 1,5-I-AEDANS identisch ist. Die gebildete Bande läuft auf nahezu gleicher Höhe wie bei SDS-Ladepuffer,  $\beta$ ME und Imidazol. Für die Versuchsdurchführung ist also zu beachten, dass diese Substanzen Signale erzeugen, welche die Bande von Interesse verdecken können.



**Abb. 2.4:** Laufverhalten verschiedener 1,5-I-AEDANS-Reaktionsprodukte. Die verschiedenen Reaktionsprodukte von 1,5-I-AEDANS zeichnen sich durch ein spezifisches Laufverhalten im SDS-Gel aus. Von links nach rechts aufgetragen sind die Produkte von 0,5 nmol 1,5-I-AEDANS mit jeweils 1  $\mu$ l von 100 mM: DTT (2), Cystein (3), SDS-Ladepuffer (4), TCEP (5),  $\beta$ ME (6),  $\text{Na}_2\text{S}$  (7), Imidazol (8), Alanin (9).

Die Probenaufarbeitung für den Assay gliedert sich in vier prinzipielle Schritte. Das Protein wird zunächst DTT-behandelt, um schon vorhandene Persulfide abzuspalten. Ein nachfolgender Pufferwechsel entfernt sowohl überschüssiges DTT als auch das im Puffer vorhandene Imidazol. Im zweiten Schritt wird das Protein mit dem Substrat L-Cystein inkubiert, um es mit Persulfid abzusättigen. Durch die folgende Zugabe von 1,5-I-AEDANS (Schritt 3) werden freie Cysteinreste sowie Persulfide markiert. Danach erfolgt optional die erneute Zugabe von L-Cystein. Dies hat den Zweck, überschüssiges 1,5-I-AEDANS zu binden und in einer Bande nahe der Lauffront zu konzentrieren. Somit steht kein freies 1,5-I-AEDANS mehr zur Verfügung, um im folgenden und letzten Schritt mit anderen Substanzen zu reagieren. Dieser Schritt beinhaltet die Abspaltung des 1,5-I-AEDANS durch die Zugabe reduzierender Agenzien.

Nach der Auftrennung im SDS-Gel können die Proben anhand der Fluoreszenz analysiert werden. Das DTT-behandelte Protein, welches freie Cysteinreste exponiert, zeichnet sich dabei durch eine starke Fluoreszenz aus (Abb. 2.5). Das Persulfid-gesättigte Protein hingegen zeigt selber keinerlei Fluoreszenz mehr. Die Persulfid-Bande tritt dafür deutlich hervor (Abb. 2.5).



**Abb. 2.5:**      **Nachweis des Persulfids an ABA3-NifS.** Die erste Spur zeigt die Fluoreszenz der DTT-vorbehandelten und daher Persulfid-freien ABA3-NifS-Domäne. In der zweiten Spur wurde mit L-Cystein vorinkubiertes ABA3-NifS aufgetragen. Die Fluoreszenz des Proteins verschwindet vollkommen. Dafür bildet sich die Bande des Persulfid-1,5-I-AEDANS-Produktes.

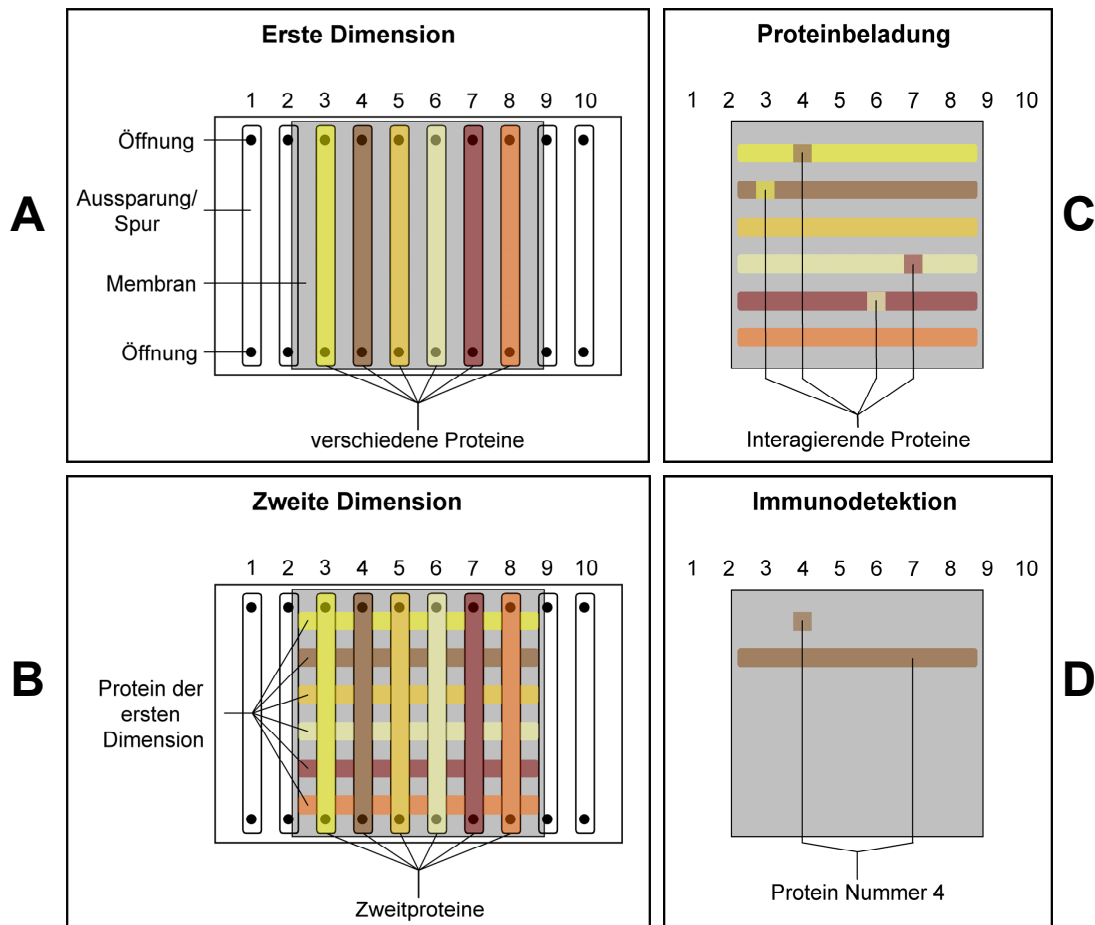
### 2.1.4 Der Slot-Blot-Interaktionsassay

Dieser Interaktionsnachweis basiert auf denselben Prinzipien wie eine Western-Analyse nach dem Dot-Blot-Verfahren. Dazu wird zunächst einer der potentiellen Interaktionspartner an einer PVDF-Membran immobilisiert. An dieses Protein kann nun nach einem Blockierungsschritt das zweite Protein binden und über Antikörper nachgewiesen werden. Dabei bringt die Herangehensweise des Dot-Blot einige Nachteile mit sich, die mit dem Slot-Blot-Verfahren ausgeschlossen werden können. Sollen z. B. verschiedene Bedingungen für die Interaktion selber getestet werden, muss die Membran in kleine, schlecht handhabbare Teile zerschnitten werden. Diese einzelnen Membranstücke müssen in nachfolgenden Schritten wie z. B. Waschen oder Färben exakt gleich behandelt werden, um die Vergleichbarkeit zu gewährleisten. Dies gestaltet sich in der Regel schwierig. Ein weiteres Problem kann die Spezifität der Antikörper mit sich bringen. Diese sollen zwar hoch spezifisch sein, in einigen Fällen treten aber trotzdem unspezifische Wechselwirkungen mit anderen Proteinen auf. Im Fall des Dot-Blot kann hier nicht unterschieden werden, ob unspezifisch das Erstprotein oder aber spezifisch das Zweitprotein erkannt wird, da sich beide Signale exakt überlagern. Es müssen also immer zusätzlich Kontrollen mitgeführt werden.

Für die Durchführung des Slot-Blot wurde die Miniblotter-Apparatur von Biometra verwendet. Sie ermöglicht es, in mehreren Spuren verschiedene Lösungen auf eine PVDF-Membran aufzubringen. Dazu wird zunächst eine äquilibrierte PVDF-Membran in die Apparatur eingespannt. Jene Proteine, die als potentielle Interaktionspartner fungieren sollen, werden in dieser ersten Dimension in den Spuren aufgetragen (Abb. 2.6, A). Dabei können die Konzentration oder sonstige Parameter variiert werden. Nachdem das Protein gebunden hat, folgt ein Blockierungsschritt für die gesamte Membran. Dabei sind gleiche Bedingungen für alle Proben gewährleistet, da die Membran in einem Stück behandelt wird.

Für die zweite Dimension wird die Membran nun erneut, diesmal jedoch um 90° gedreht, in die Apparatur eingespannt. Die Spur der ersten Dimension verläuft nun im rechten Winkel zu den Spuren der zweiten Dimension (Abb. 2.6, B). Die Proben mit den Zweitproteinen werden nun geladen, so dass die Proteine auf den Schnittflächen die Möglichkeit bekommen, zu interagieren (Abb. 2.6, C). Nach Ende der Inkubation wird die gesamte Membran in Waschlösung überführt. Auch hier ist die Behandlung aller Proben somit identisch. Für die nachfolgende Antikörper-Behandlung muss die Membran allerdings nach wie vor zerteilt werden, wenn verschieden Proteine durch unterschiedliche Antikörper detektiert werden sollen. Die Verwendung der Antikörper entspricht ab hier dem gängigen Protokoll. Wenn sowohl in der ersten als auch in der zweiten Dimension ein Protein verwendet wurde, welches nun mittels Antikörper detektiert wird, ergeben sich zwei verschiedene Signale. Das

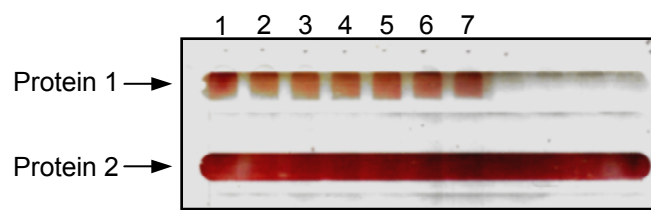
Protein der ersten Dimension führt zu einem durchgehenden Signal entlang der gesamten Spur, interagierendes Protein der zweiten Dimension formt ein kleines Quadrat. So können beide Situationen leicht unterschieden werden (Abb. 2.6, D).



**Abb. 2.6:** **Schema des Slot-Blot-Interaktionsassays.** In einem vierstufigen Prozess wird Protein-Protein-Interaktion nachgewiesen. (A) In der ersten Dimension werden beliebige Proteine in Spuren an einer PVDF-Membran immobilisiert. (B) Die potentiellen Interaktionspartner werden im rechten Winkel zu den Spuren der ersten Dimension aufgetragen. (C) Nach dem Waschen bleiben lediglich interagierende Proteine der zweiten Dimension gebunden. (D) Wird durch den Antikörper ein Protein der ersten Dimension erkannt, bildet sich eine Spur. Wird das interagierende Protein der zweiten Dimension detektiert, formt sich ein Quadrat. Das Bild zeigt die Signale bei Verwendung eines Antikörpers gegen Protein Nummer 4.

Ein exemplarisches Ergebnis für einen solchen Interaktionsnachweis ist in Abbildung 2.7 dargestellt. Getestet wurde hier der Einfluss steigender NaCl-Konzentrationen im Puffer auf die Interaktionsfähigkeit zweier Proteine. In 7 verschiedenen Ansätzen wurde die Salzkonzentration dabei von 0 mM auf 300 mM erhöht. Das in der ersten Dimension immobilisierte Protein 1 ist dabei für alle Ansätze in identischer Menge und Form an der Membran gebunden (Abb. 2.6, Protein 1). Die Membran konnte nach dem Interaktionschritt im Ganzen weiterbehandelt werden. Dies gewährleistet die Gleichbehandlung und Vergleichbarkeit aller sieben Proben.

Ein gegen Protein 2 gerichteter Antikörper wurde verwendet, um die Interaktion nachzuweisen. In diesem Fall ist kaum ein Einfluss der Salzkonzentration auf die Interaktionsfähigkeit der beiden Proteine zu erkennen. Die obere Spur zeigt deutlich, dass Protein 1 nicht von dem Antikörper erkannt wird. Die quadratischen Signale sind also ausschließlich auf gebundenes Protein 2 zurückzuführen.

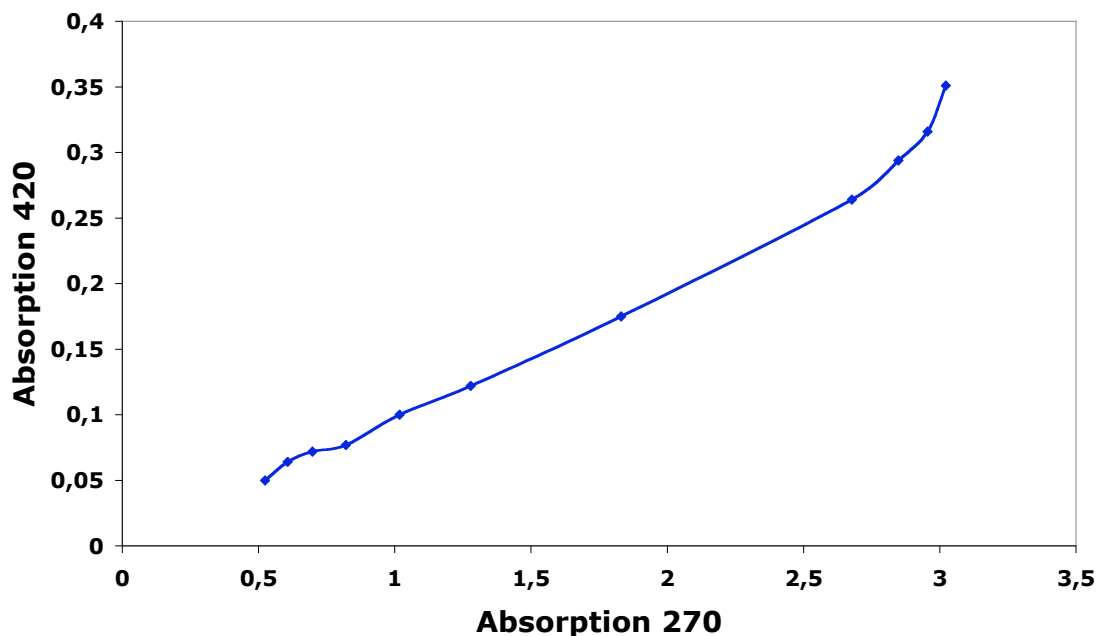


**Abb. 2.7:** Beispiel für Protein-Protein-Interaktion im Slot-Blot-Verfahren. In erster Dimension wurden Protein 1 und 2 aufgetragen. In zweiter Dimension wurde Protein 2 in 20 mM NaPi, pH 8 mit steigenden NaCl-Konzentrationen (0, 10, 20, 50, 100, 200, 300 mM) aufgetragen. Ein gegen Protein 2 gerichteter Antikörper belegt die Interaktion von Protein 1 an Protein 2 in allen getesteten Lösungen (1-7). Protein 1 wird nicht erkannt.

### 2.1.5 Das Protein/PLP-Absorptionsratio

Das Protein-gebundene PLP zeichnet sich durch ein eindeutiges Absorptionsmaximum bei 420 nm aus. Um die Saturierung verschiedener Protein-Chargen mit PLP vergleichend einfacher bestimmen zu können als unter 2.2.2 beschrieben, wurde untersucht, ob die Absorption des Protein-gebundenen PLP proportional zur Proteinkonzentration ansteigt. Dabei ergab sich ein linearer Bereich für Proteinkonzentrationen zwischen 0,75 und 2,5 µg/µl (Abb. 2.7). Für ABA3-NifS, welches unter Standard-Expressionsbedingungen exprimiert wurde, ergibt sich für das Verhältnis aus Proteinabsorption (hier Maximum bei 270 nm) und PLP-Absorption (420 nm) in diesem linearen Bereich ein Wert von ca. 7.

Für verschiedene Protein-Chargen kann nun leicht der entsprechende Wert ermittelt werden. Ist er niedriger, hat das Protein mehr PLP gebunden. Eine Quantifizierung ist hiermit aber nicht möglich.



**Abb. 2.8:** **Das Protein/PLP-Ratio.** In dem Konzentrationsbereich von 0,75 bis 2,75  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  steigt die Absorption bei 420 nm proportional zur Proteinabsorption. Für ABA3-NifS ergibt sich unter Standard-Expressionsbedingungen ein Quotient (270 nm / 420nm) von ca. 7.

## 2.2 Biochemische Charakterisierung von ABA3-NifS

Die Moco-Sulfurase ABA3 aus *Arabidopsis thaliana* wurde bereits grundlegend biochemisch charakterisiert (Bittner *et al.*, 2001). Die Analyse der separaten Domänen in Bezug auf ihre jeweilige Funktionen und ihr Zusammenspiel musste jedoch noch vorgenommen werden.

Da zwischen der  $\text{NH}_2$ -terminalen Domäne von ABA3 und NifS-ähnlichen Proteinen signifikante Ähnlichkeiten festgestellt werden konnten, war ein Aspekt dieser Arbeit, diese Homologien zu untermauern und die Gleichartigkeit des Reaktionsmechanismus zur Schwefel-Mobilisierung zu belegen. Ein Hauptaugenmerk lag dabei auf der zweifelsfreien Identifizierung der gebundenen Cofaktoren sowie Reaktions-Intermediate.

Um den Mechanismus der Schwefel-Mobilisierung und -Übertragung in seinen einzelnen Schritten zu verstehen, wurden Proteinvarianten untersucht, welche in konservierten und putativ am Mechanismus beteiligten Motiven Mutationen tragen. Unter den verschiedenen

Fragestellungen wurden sie im Hinblick auf Aktivität oder charakteristische Eigenschaften mit dem Wildtyp-Protein verglichen. Bei diesen Varianten handelt es sich um artifiziell erstellte Mutationen mit der Zielsetzung, an definierter Stelle in den Reaktionsablauf einzugreifen.

Der Zweite Hauptaspekt war die Erforschung der Interaktion der beiden ABA3-Domänen. Die C-terminale Domäne ist zwar an der Mobilisierung des Schwefels selbst offenbar nicht beteiligt, *in vivo* aber essentiell für die Übertragung des Schwefels auf die Zielproteine. Den Weg des Schwefels vom Substrat über die NH<sub>2</sub>-terminale ABA3-Domäne und unter Beteiligung der C-terminalen Domäne auf die Zielproteine nachzuvollziehen, war Bestandteil dieser Arbeit.

Zusätzlich zu den artifiziell erstellten Protein-Varianten waren aber noch weitere, natürliche Moco-Sulfurase-Mutanten aus den unterschiedlichsten Organismen bekannt. Welche Effekte die jeweiligen Mutationen auf den Reaktionsmechanismus haben, soll in einem separaten Kapitel behandelt werden.

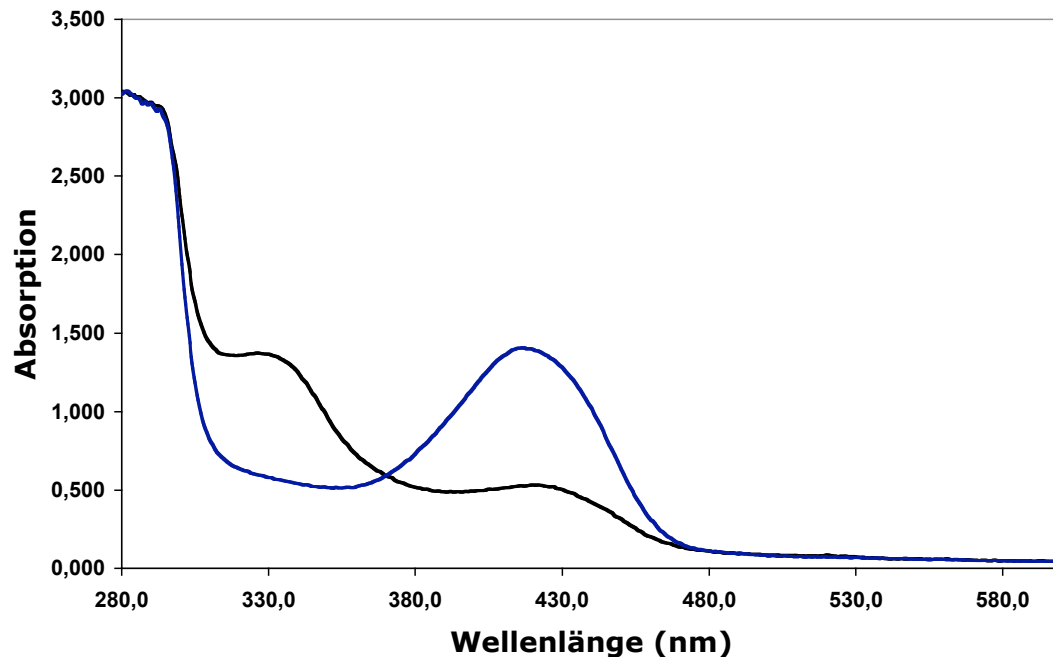
Die Konstrukte zur rekombinanten Expression der Varianten sowie der Wildtyp-Proteine standen zum Teil zur Verfügung. Neue Konstrukte wurden mit Standard-Klonierungstechniken und PCR-Mutagenese erstellt.

### 2.2.1 Spektrale Eigenschaften von ABA3-NifS

Unter Standardbedingungen rekombinant exprimiertes und aufgereinigtes ABA3-NifS zeichnet sich durch eine intensive Gelbfärbung aus. Um das spezifische Absorptionsverhalten des Proteins zu analysieren, wurde ein Spektrum im Wellenlängenbereich von 280 bis 900 nm aufgenommen. Im Bereich über 600 nm ist keine Absorption zu verzeichnen, weshalb nur der Ausschnitt bis 600 nm dargestellt wird (Abb. 2.9). Verglichen wird hier DTT-behandeltes Protein mit L-Cystein-saturiertem Protein. Für das DTT-behandelte Protein ist ein Absorptionspeak bei 420 nm typisch. Er ist charakteristisch für einen gebundenen PLP-Cofaktor und verursacht die Gelbfärbung des Proteins (Zheng *et al.*, 1992). Dieses Absorptionsverhalten findet man in fast identischer Form bei vielen NifS-ähnlichen Proteinen.

Im Verlauf der Inkubation mit L-Cystein tritt eine deutliche Veränderung des Absorptionsverhaltens hervor. Für das bloße Auge erkennbar, beginnt das Protein sich zu entfärben. Damit verbunden ist eine signifikante Abnahme des Absorptionspeaks bei 420 nm und das Entstehen eines Peaks bei 320 nm. Dies untermauert die Beteiligung des potentiellen PLP-Cofaktors an der Substratbindung. Nach diesen ersten Erkenntnissen sollte die Natur des farbgebenden Cofaktors eindeutig geklärt werden.



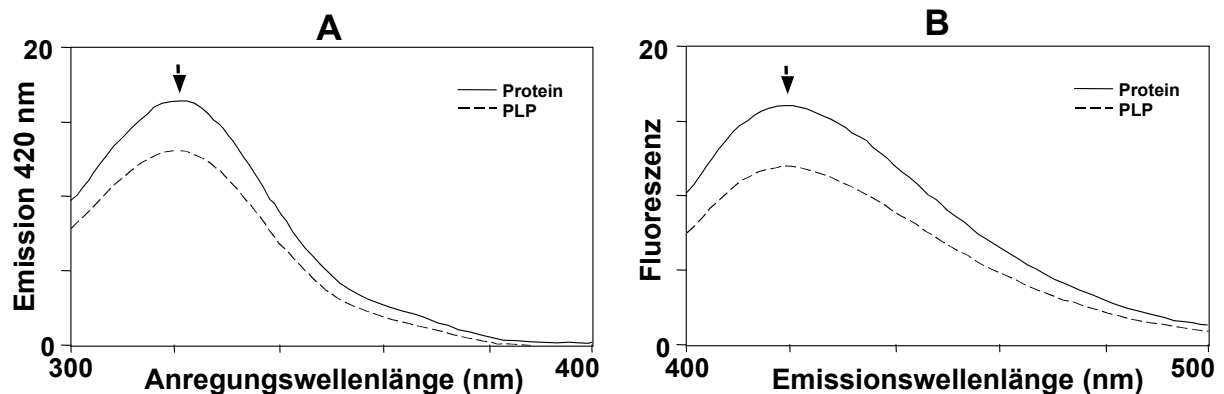


**Abb. 2.9:** **Spektrale Eigenschaften von ABA3-NifS.** DTT-behandeltes Protein (blau) zeigt einen Absorptionspeak bei 420 nm. Durch Inkubation mit L-Cystein (schwarz) reduziert sich dieser Peak unter Bildung eines Absorptionsmaximums bei 320 nm.

### 2.2.2 Identifizierung des PLP-Cofaktors

Der spezifische Nachweis des Reaktionsproduktes aus PLP und Cyanid nach Adams (1969) wurde angewendet, um die Natur des Chromophors von ABA3-NifS zu analysieren. Aus verschiedenen Gründen wurde angenommen, dass es sich bei dem chromophoren Cofaktor von ABA3-NifS um PLP handelt. Zunächst ist die gelbe Farbe typisch für PLP-abhängige Proteine. Die spektrale Untersuchung erbrachte den für PLP typischen Absorptionspeak bei 420 nm. Für NifS aus *A. vinelandii* konnte PLP als essentieller Cofaktor schon früher identifiziert werden (Zheng *et al.*, 1992). Die Homologien zwischen ABA3 und NifS-ähnlichen Proteinen bestärkten somit die Vermutung, dass es sich tatsächlich um PLP handelt. Die hier angewendete Methode sollte nun aufgrund ihrer hohen Spezifität endgültig Gewissheit über die Natur des Cofaktors bringen.

Hierzu wurden die Absorptions- sowie Emissionsspektren einer aufbereiteten Proteinprobe mit einem PLP-Standard verglichen (Abb. 2.10). Dabei konnten nahezu identische Maxima der beiden Proben beobachtet werden. Da es sich um ein sehr spezifisches Reaktionsprodukt aus PLP und Cyanid mit charakteristischen optischen Eigenschaften handelt, gilt dies als Beweis dafür, dass es sich bei dem ABA3-Cofaktor in der Tat um PLP handelt.



**Abb. 2.10: Vergleich der Anregungs- und Emissionsspektren von PLP und ABA3-NifS.** (A) Die bei 420 nm gemessene Emission nach Anregung mit Licht der Wellenlängen 300 bis 400 nm von PLP und ABA3-NifS zeigt ein übereinstimmendes Maximum bei 325 nm. (B) Bei Anregung mit Licht der Wellenlänge 325 nm zeigen PLP und ABA3 eine maximale Emission bei 420 nm.

### 2.2.2.1 Saturierung von ABA3-NifS mit PLP

Die Methode, welche für die Identifizierung des PLP eingesetzt wurde, konnte auch für eine Quantifizierung angewendet werden. Dies machte lediglich die Erstellung eines PLP-Standards notwendig. Die Bestimmung des PLP-Gehaltes von ABA3-NifS ergab dabei, dass unter Standard-Expressionsbedingungen nur ca. 60% des Proteins einen PLP-Cofaktor gebunden haben.

Um die Saturierung mit PLP am Wildtyp-Protein zu erhöhen, wurde der Expressionskultur in verschiedenen Mengen der PLP-Vorläufer Pyridoxin zugegeben. Dabei zeigte sich, dass mit steigenden Pyridoxin-Mengen im Medium die Zell- bzw. Proteinausbeute zwar sank, die Saturierung mit PLP aber deutlich, auf über 90% gesteigert werden konnte. So konnte mit 5 mM Pyridoxin im Medium eine Saturierung des Proteins von 90,9% PLP gemessen werden (Tab. 2.1).

Bei Homologiestudien NifS-ähnlicher Proteine tritt ein stark konserviertes PLP-Bindemotiv hervor. Für ein in diesem Motiv gelegenes Lysin konnte eine essentielle Beteiligung an der PLP-Bindung gezeigt werden (Zheng *et al.*, 1993). Dieses Lysin hat in ABA3 seine Entsprechung an Aminosäure-Position 271. Um seine Wichtigkeit für die PLP-Bindung in ABA3 zu belegen, wurde die K271S-Variante des ABA3-NifS mit der Methode nach Adams auf seinen PLP-Gehalt hin untersucht. Für das rekombinant exprimierte und aufgereinigte

Protein ergab sich eine PLP-Saturierung von nur 3,8%. Das Lysin ist somit offenbar von großer Bedeutung für die stabile Bindung des Cofaktors.

**Tab. 2.1:**      **Saturierung von ABA3-NifS mit PLP.** Durch die Zugabe von Pyridoxin zum Expressionsmedium konnte die Saturierung von ABA3-NifS mit PLP von 63% auf über 90% gesteigert werden. Der Austausch des Lysin 271 durch ein Serin führt zu einer starken Reduktion des PLP-Gehaltes.

Zugabe von Pyridoxin	Saturierung
-	63%
1 mM	70%
2 mM	77,8%
5 mM	90,9%
ABA3-NifS K271S	3,8%

### 2.2.3      Bestimmung des gebundenen Persulfids

Die Bildung eines proteingebundenen Persulfids bei der Umsetzung von L-Cystein durch ABA3-NifS sollte über eine bereits beschriebene Methode (Zheng *et al.*, 1994) mit Hilfe von 1,5-I-AEDANS nachgewiesen werden. Dafür wurden 250 µg ABA3-NifS in einem Volumen von 500 µl mit 1 mM L-Cystein für 30 min bei 22°C inkubiert. Der Überschuss an Substrat wurde über Pufferwechsel in einem Microcon-Konzentrator (MWCO 30,000) entfernt. Anschließend wurde das Protein bei 25°C für 1 min mit 0,2 mM der thiol-spezifischen Substanz 1,5-I-AEDANS inkubiert. Wie zuvor wird über einen Konzentrator umgepuffert, um den Überschuss an 1,5-I-AEDANS zu entfernen. Nachfolgend wurde dem Ansatz 1 mM DTT zugegeben. Diese reduzierende Substanz spaltet Disulfidbrücken und löst somit all jene 1,5-I-AEDANS-Moleküle vom Protein ab, die über ein Persulfid gebunden sind. Über einen weiteren Konzentrator-Schritt wurde diese niedermolekulare Fraktion nun von der Proteinfraction separiert. Über die spezifische Fluoreszenz (Anregung: 322 nm; Emission: 438 nm) des 1,5-I-AEDANS konnte die Menge des gebildeten Persulfids bestimmt werden. Für ABA3-NifS konnte über die Zunahme der Fluoreszenz eindeutig ein Persulfid gezeigt werden (Tab. 2.2). Für den Cystein-Rest an Position 325 des NifS-Proteins aus *A. vinelandii*

konnte eine Beteiligung an dem Reaktionsmechanismus belegt werden (Zheng *et al.*, 1994). Protein-Varianten, in denen dieses Cystein gegen ein Alanin ausgetauscht wurde, verloren gänzlich ihre Fähigkeit, ein Persulfid zu bilden. Die entsprechende ABA3-NifS C430A Protein-Variante wurde daher neben dem Wildtyp-Protein ebenfalls in diesem Assay vermessen. Sie zeigt einen erniedrigten Persulfid-Gehalt (Tab. 2.2). Als Referenz wurde Wildtyp-Protein verwendet, welches nicht mit L-Cystein vorinkubiert wurde (Tab. 2.2).

**Tab. 2.2:** **Nachweis eines Persulfids.** Jeweils 250 µg Protein wurden mit 1 mM Cystein inkubiert und dann mit 1,5-I-AEDANS und DTT behandelt. Die Werte für die Fluoreszenz ergeben sich im Vergleich mit Protein ohne Cystein-Behandlung. ABA3-NifS C430A weist bei gleicher Behandlung einen deutlich niedrigeren Persulfid-Gehalt auf.

Protein	Erhöhung der Fluoreszenz Anregung: 322 nm Emission: 438 nm	Fluoreszenz-Ratio ABA3-NifS: ABA3-NifS C430A
ABA3-NifS	59,7 ± 4,9	-
ABA3-NifS C430A	11,3 ± 1,6	18,9%

#### 2.2.4 Bestimmung des Moco/MPT-Gehaltes von ABA3-NifS

Die Funktion der ABA3-NifS-Domäne als Cystein-Desulfurase zur Mobilisierung des Schwefels aus L-Cystein konnte klar gezeigt werden. Der Moco der Zielproteine als terminaler Empfänger dieses Schwefels steht ebenfalls außer Frage. Über den Weg des Schwefels und die genauen Transfermechanismen ist bislang jedoch nichts bekannt. Neben weiteren Szenarien kommt auch der Austausch eines kompletten Moco in Frage. In diesem Fall könnte der Schwefel zunächst auf einen an ABA3-NifS gebundenen Moco übertragen werden, welcher dann komplett auf das Zielprotein transferiert würde. Aus diesem Grund sollte ABA3-NifS auf seinen Moco-Gehalt hin untersucht werden.

Unter Standardbedingungen rekombinant exprimiertes ABA3-NifS wurde für die FormA-Analyse aufgereinigt. Bei der nachfolgenden Bestimmung der Moco/MPT-Menge ergab sich eine Saturierung von 0,8%. Da die sauerstoffsensitive Natur des Moco bekannt war, sollte über eine Verringerung der Sauerstoffkonzentration im Expressionsansatz die Saturierung erhöht werden. Um dies zu erreichen, wurden die Kolben bei ca. 50 rpm anstatt 180 rpm inkubiert. Die IPTG-Menge für die Induktion wurde von 0,1 mM auf 0,05 mM gesenkt und die Kolben zusätzlich mit Parafilm verschlossen. Unter diesen Bedingungen konnte die Saturierung von ABA3-NifS mit Moco/MPT auf ca. 5 % erhöht werden.

### 2.2.5 Die Aktivitäten von ABA3-NifS

Die biologisch relevante Aktivität besteht für ABA3 in der Mobilisierung eines Schwefels aus dem Substrat L-Cystein und dessen Übertragung auf den Moco der Zielproteine AO und XDH. Die NH<sub>2</sub>-terminal gelegene NifS-ähnliche Domäne übernimmt dabei den Part der L-Cystein-Desulfurierung und Bereitstellung des Schwefels in Form eines Persulfids. Für die Übertragung des Schwefels auf AO und XDH *in vivo* ist die C-terminale Domäne essentiell. In *in vitro*-Experimenten konnte eine direkte Aktivierung der AO durch ABA3 gezeigt werden (Bittner *et al.*, 2001). Nun sollte die separat exprimierte ABA3-NifS-Domäne auch auf diese Aktivität hin untersucht werden.

Für NifS-ähnliche Proteine konnte früh eine weitere Funktion gezeigt werden. Dabei handelt es sich um die Umwandlung von L-Selenocystein zu Selenid und L-Alanin (Mihara *et al.*, 1997). Man spricht hierbei von der Selenocystein-Lyase-Aktivität. Aufgrund seiner signifikanten Homologien zu NifS-Proteinen sollte auch bei ABA3-NifS daher zusätzlich nach dieser Aktivität gesucht werden.

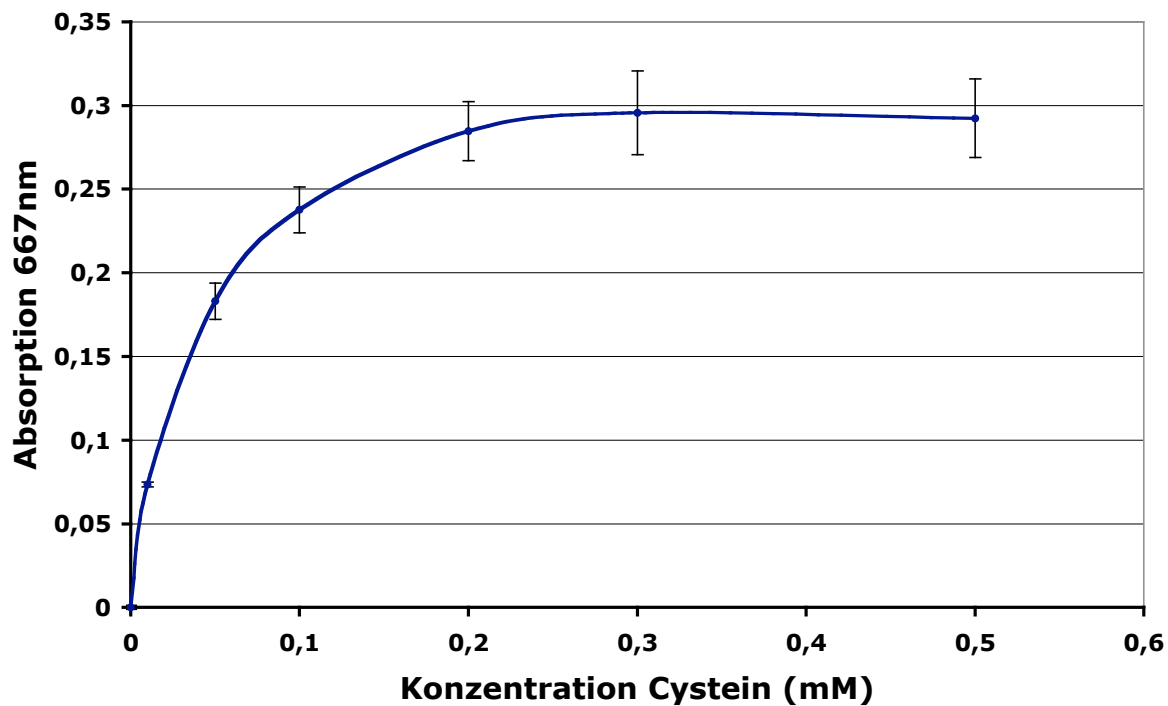
Zudem wurde in einem *in vitro* Rekonstitutionsassay analysiert, ob ABA3-NifS *in vitro* die Rolle von NifS aus *A. vinelandii* übernehmen kann. Diese besteht *in vivo* in der Bereitstellung eines Schwefels für die Synthese von Fe/S-Clustern, welche unter Beteiligung weiterer Nif-Proteine auf die Apo-Nitrogenase übertragen werden und ihr so ihre Aktivität verleihen.

#### 2.2.5.1 Die L-Cystein-Desulfurase-Aktivität

Die Bestimmung der Umsatzgeschwindigkeit für L-Cystein ist für ABA3-NifS nicht ohne weiteres möglich. Bei der Umsetzung des Substrates entstehen nicht wie bei vielen anderen enzymatisch katalysierten Reaktionen zwei Produkte, die von dem Enzym wieder entlassen werden, sondern der Schwefel bleibt in Form eines Persulfids am Protein gebunden. So lange der Cystein-Rest im aktiven Zentrum schwefelbeladen ist, kann kein weiterer Umsatz des Substrates stattfinden. Das Persulfid muss somit erst in einem zweiten Reaktionsschritt entfernt werden. Dies geschieht *in vitro* unter Zuhilfenahme reduzierender Agenzien wie DTT,  $\beta$ ME oder TCEP. Dieser Reaktionsschritt ist langsamer als die Bildung des Persulfids selber und somit der Geschwindigkeit bestimmende Schritt. In Abhängigkeit des gewählten Reduktionsmittels variiert daher die gemessene Umsatzgeschwindigkeit.

Die Bestimmung des K<sub>m</sub>-Wertes für L-Cystein erfolgte über die Messung des gebildeten H<sub>2</sub>S im Methylenblau-Aktivitätsassay. Die Reaktion fand in 350  $\mu$ l 100 mM Tris pH 9,3 in

Anwesenheit von 20  $\mu\text{g}$  ABA3-NifS, 2 mM DTT und 0,01-0,5 mM L-Cystein statt (Abb. 2.11). Die Inkubationszeit betrug 15 min bei 37°C unter Schütteln. Unter diesen Bedingungen konnte die maximale Umsatzgeschwindigkeit für eine Substratkonzentration von 0,3 mM Cystein bestimmt werden. Für ABA3-NifS ergab sich unter den hier verwendeten Bedingungen für das Substrat L-Cystein ein  $K_m$ -Wert von 35  $\mu\text{M}$ .



**Abb. 2.11:**  $K_m$ -Wert von ABA3-NifS für L-Cystein. Bei der Umsetzung von L-Cystein zu Alanin und Persulfid in 100 mM Tris pH 9,3 mit 2 mM DTT bei 37°C für 15 min erreicht ABA3-NifS bei einer Konzentration von 35  $\mu\text{M}$  Substrat seine halbmaximale Geschwindigkeit. Gemessen wurde die Produktion von  $\text{H}_2\text{S}$  im Methylenblau-Assay.

Da die vorläufig optimalen Bedingungen für den Umsatz von L-Cystein durch ABA3-NifS somit gefunden waren, sollte nun die Bestimmung der spezifischen Aktivität vorgenommen werden. Dazu wurde die Menge des bei 0,3 mM L-Cystein gebildeten  $\text{H}_2\text{S}$  anhand eines  $\text{Na}_2\text{S}$ -Standards quantifiziert. Als vorläufiger Wert für die spezifische Aktivität ergab sich dabei ein Wert von 3,7 mol Produkt  $\cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$  Protein (67 mU  $\cdot \text{mg}^{-1}$ ).

Um die Wichtigkeit der konservierten und putativ am Mechanismus beteiligten Motive zu belegen, wurden die entsprechenden Proteinvarianten in Bezug auf ihre L-Cystein-Desulfurase-Aktivität mit dem Wildtyp-Protein verglichen. Für die K271S-Variante konnte bereits ein deutlich reduzierter PLP-Gehalt gezeigt werden (s. 2.2.2.1). Dieses Protein ist

auch in seiner Aktivität stark eingeschränkt und erreicht nur ca. 1,7 % der Wildtyp-Aktivität (Tab. 2.3). Für das konservierte Cystein an Aminosäure-Position 430 wurde ebenfalls eine Beteiligung an dem Mechanismus der L-Cystein-Desulfurierung angenommen. Die Analyse unter 2.2.3 belegte bereits einen deutlich reduzierten Persulfid-Gehalt der C430A-Protein-Variante. Die Messung der spezifischen Aktivität bestätigte nun dieses Ergebnis. Im Vergleich zum Wildtyp-Protein hat dieses Protein eine Restaktivität von nur 18 % (Tab. 2.3). Im Vergleich dazu resultiert die korrespondierende C325A-Mutation in NifS aus *A. vinelandii* in einem vollständigen Verlust der Aktivität (Zheng *et al.*, 1994). Um eine Erklärung für die somit relativ hohe Restaktivität zu finden, wurden zwei weitere, sehr nahe gelegene Cystein-Reste untersucht. Dabei handelt es sich jeweils um ein Cystein an Position 428 sowie Position 435. Sie sind zwar nicht unter den NifS-ähnlichen Proteinen, wohl aber unter allen bekannten Moco-Sulfurasen konserviert. Aufgrund ihrer Nähe zu C430 konnte nicht ausgeschlossen werden, dass sie im Fall von ABA3 in den Reaktionsmechanismus eingreifen können. Die erstellten Doppelmutanten C428/430A und C430/435A erreichten 30 % bzw. 32 % der Wildtyp-Aktivität und erhöhen somit die Aktivität im Vergleich zur Einzelmutation (Tabelle 2.3).

**Tab. 2.3:** **L-Cystein-Desulfurase-Aktivität der ABA3-NifS Varianten.** Die gemessene Aktivität von ABA3-NifS wurde auf 100 % gesetzt. Im Vergleich dazu erreicht die ABA3-K271S-Variante lediglich 1,7 % der Aktivität. ABA3-NifS C430A hat ca. 18 % Restaktivität, die Varianten mit Doppelmutationen 30 % (ABA3-NifS C428/430A) bzw. 32 % (ABA3-NifS C430/435A).

Protein	L-Cystein-Desulfurase-Aktivität (%)
ABA3-NifS	100
ABA3-NifS K271S	1,7
ABA3-NifS C430A	18
ABA3-NifS C428/430A	30
ABA3-NifS C430/435A	32

### 2.2.5.2 Die Selenocystein-Lyase-Aktivität

Die Bestimmung der Selenocystein-Lyase-Aktivität erfolgte zum einen nach der Methode von Esaki *et al.* (1982) als H<sub>2</sub>Se und zum anderen anhand des gebildeten L-Alanins. Dabei konnte gezeigt werden, dass ABA3-NifS tatsächlich über eine L-Selenocystein-Lyase-Aktivität verfügt.

Dazu wurden 20 µg Protein in 50 mM Tris/HCl pH 9,3 in Anwesenheit von 2 mM DTT bei 37°C mit dem frisch präparierten Substrat für 5 min inkubiert. Das Substrat wurde unter anaeroben Bedingungen durch die Vorinkubation von 5 Mol DTT / Mol L-Selenocystein hergestellt, wie durch Esaki *et al.* (1982) beschrieben. Für die Bestimmung des  $K_m$ -Wertes wurde das Substrat in den Konzentrationen 0,005-1 mM eingesetzt. Die Messung der Absorption des aus  $H_2Se$  gebildeten Bleiselenids bei 400 nm ergab dabei einen  $K_m$  von 200 µM. Daraus wird ersichtlich, dass ABA3 das Substrat L-Cystein mit einem  $K_m$  von 35 µM gegenüber L-Selenocystein bevorzugt. Die Bestimmung der spezifischen Aktivität für L-Selenocystein erfolgte über die Messung des gebildeten L-Alanins. Dazu wurden 20 µg ABA3-NifS mit 0,5 mM Substrat für 10 min bei 37°C in Anwesenheit von 2 mM DTT inkubiert. Für L-Selenocystein ergibt sich dabei eine spezifische Aktivität von  $21,4 \text{ mol Produkt} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1} \text{ Protein}$ . Obwohl ABA3-NifS also L-Cystein als Substrat bevorzugt, findet der Umsatz von L-Selenocystein deutlich schneller statt. Die für die L-Cystein-Desulfurase-Aktivität essentiellen Motive wurden anhand der erstellten Proteinvarianten auch auf ihre Beteiligung an der L-Selenocystein-Lyase-Aktivität hin untersucht. Wie für andere Selenocystein-Lyasen gezeigt (Mihara *et al.*, 2000), ist der gebundene PLP-Cofaktor essentiell. Für den Cystein-Rest an Position 430 werden jedoch abweichende Beobachtungen gemacht. Obwohl für diesen Aminosäurerest in NifS-Proteinen keine Beteiligung an der Selenocystein-Lyase-Reaktion gezeigt werden konnte (Mihara *et al.*, 1982; Mihara & Esaki, 2002), ist die entsprechende Mutante von ABA3 stark in ihrer Aktivität eingeschränkt (Tabelle 2.4). Bei der Präparation des Substrates L-Selenocystein war zu beobachten, dass der pH-Wert deutlich gesenkt wird. Auch der Reaktionsmix hatte einen niedrigen pH-Wert. Da der Einfluss des pH-Wertes auf die Aktivität von ABA3-NifS bekannt ist, können die erhaltenen spezifischen Aktivitäten somit nur mit gewisser Einschränkung betrachtet werden.

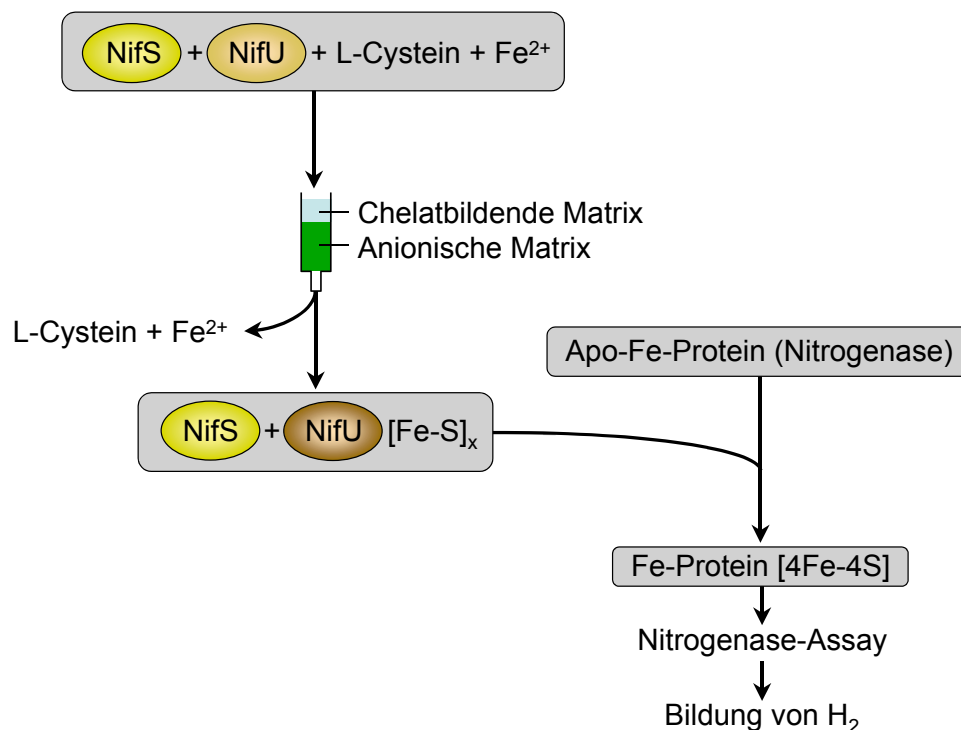
**Tab. 2.4:** **L-Selenocystein-Lyase-Aktivität der ABA3-NifS Varianten.** Die gemessene Aktivität von ABA3-NifS wurde auf 100 % gesetzt. Im Vergleich dazu erreicht die ABA3-K271S-Variante lediglich 1,1 % der Aktivität. ABA3-NifS C430A hat ca. 19,6 % Restaktivität.

Protein	L-Selenocystein-Lyase-Aktivität (%)
ABA3-NifS	100
ABA3-NifS K271S	1,1
ABA3-NifS C430A	19,6



### 2.2.5.3 Die Assemblierung von Eisen/Schwefel-Clustern

Die biologische Bedeutung der L-Cystein-Desulfurase NifS aus *A. vinelandii* liegt in der Bereitstellung des Schwefels zur Synthese von Fe/S-Clustern der Nitrogenase. Im Zusammenwirken mit NifU, einem Plattform-Protein, werden die Cluster assembliert und in einem zweiten Schritt auf das Apo-Nitrogenase-Protein übertragen, welches erst dann seine Aktivität erhält. Das System zur Assemblierung von Fe/S-Clustern auf der Nitrogenase kann unter Berücksichtigung aller wichtigen Komponenten *in vitro* nachgestellt werden (Dos Santos *et al.*, 2004; Abb. 2.12). Mit diesem *in-vitro*-System kann die Aktivität des NifS-Proteins sowie der anderen Proteinkomponenten überprüft werden.



**Abb. 2.12:** *In vitro*-Assemblierung von Fe/S-Clustern (nach P.C. Dos Santos, 2004). Die Proteine NifS und NifU assemblieren in Anwesenheit von L-Cystein und  $\text{Fe}^{2+}$  Fe/S-Cluster. Diese werden auf die Apo-Fe-Nitrogenase übertragen, wodurch das Protein aktiviert wird. Die Aktivität kann anhand der Produktion von Wasserstoff bestimmt werden.

Um die funktionelle Ähnlichkeit zwischen *A. vinelandii* NifS und ABA3-NifS zu untermauern, wurde das ursprüngliche NifS-Protein aus dem Ansatz entfernt und durch ABA3-NifS ersetzt. Die Effektivität der Fe/S-Cluster-Assemblierung wurde für ABA3-NifS und einige mutagenisierte ABA3-NifS-Proteine bestimmt.

Zur Ermittlung der Effektivität wurde dafür die Nitrogenase-Aktivität eines Kontrollansatzes mit *A. vinelandii*-NifS auf 100% gesetzt.

Es zeigte sich, dass unter Verwendung von ABA3-NifS bis zu 74% der Nitrogenase-Aktivität des Kontrollansatzes erreicht wurden. Für das Protein ABA3-NifS C430A, für welches eine deutliche Verminderung der L-Cystein-Desulfurase-Aktivität bekannt war, konnten lediglich 6%, für die Doppelmutanten ABA3-NifS C428/430A und C430/435A 5% bzw. 10% der Aktivität gemessen werden (Tabelle 2.5).

Die hohe Effektivität, mit der ABA3-NifS das Protein aus *A. vinelandii* ersetzen kann, untermauert die beobachteten Homologien und die Annahme mechanistischer Übereinstimmungen bei der Mobilisierung des Schwefels.

**Tab. 2.5: Bereitstellung des Schwefels für die Fe/S-Cluster-Synthese.** Die ermittelte Aktivität der Nitrogenase nach Bereitstellung des Schwefels für die Fe/S-Cluster-Synthese durch *A. vinelandii*-NifS wurde auf 100 % gesetzt. Die im Vergleich dazu ermittelte Nitrogenase-Aktivität mit ABA3-NifS beträgt ca. 74 %. Mit den Protein-Varianten ABA3-NifS C430A, ABA3-NifS C428/430A und ABA3-NifS C430/435A ist die Nitrogenase-Aktivität mit 6 %, 5 % und 10% stark eingeschränkt.

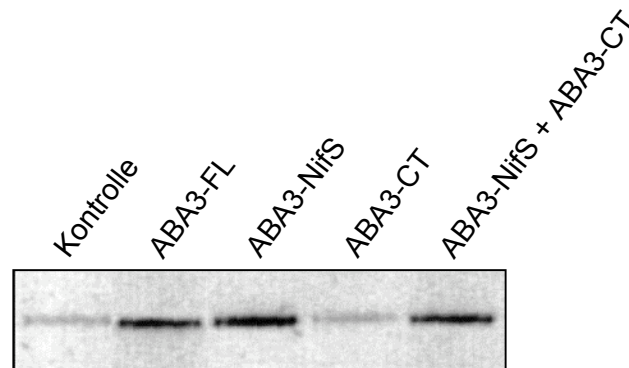
Protein	Nitrogenase-Aktivität (%)
<i>A. vinelandii</i> NifS	100
ABA3-NifS	74
ABA3-NifS C430A	6
ABA3-NifS C428/430A	5
ABA3-NifS C430/435A	10

#### 2.2.5.4 *In vitro* Aktivierung der Aldehydoxidase AO $\alpha$

In den unter 2.2 durchgeführten Assays konnte gezeigt werden, dass ABA3-NifS alle Funktionen aufweist, um selbstständig L-Cystein zu L-Alanin umzusetzen und den entstandenen Schwefel als Persulfid zu binden. Obwohl *in vivo* gezeigt werden konnte, dass die C-terminale ABA3-Domäne essentiell für die Sulfurierung der Zielproteine AO/XOR ist, sollte nicht ausgeschlossen werden, dass dies auf einen rein regulatorischen Effekt zurückzuführen ist. Daher wurde ABA3-NifS *in vitro* auf seine Fähigkeit hin untersucht, den gebildeten Persulfid-Schwefel direkt auf die Zielproteine zu übertragen.

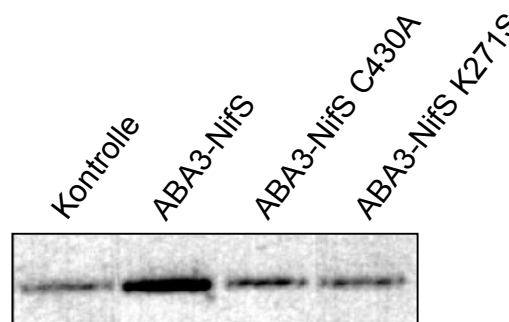
Zu diesem Zweck wurde rekombinant in *Pichia Pastoris* exprimierte AO $\alpha$  mittels KCN inaktiviert und in verschiedenen Rekonstitutionsansätzen mit ABA3-NifS, ABA3-FL sowie

Moco-freiem ABA3-CT in Anwesenheit von L-Cystein inkubiert. Dazu wurde 1 µg der inaktivierten AO mit dem 10fachen molaren Überschuss des entsprechenden Proteins für 1 h bei 37°C mit 0,5 mM L-Cystein inkubiert. Die Bestimmung der AO-Aktivität erfolgte über die semiquantitative Aktivitätsfärbung im nativen Gel. Dabei war eine Steigerung der AO-Aktivität für die Ansätze mit ABA3-FL, ABA3-NifS sowie der Mischung aus ABA3-NifS und ABA3-CT zu sehen (Abb. 2.13). ABA3-CT allein hatte hier keinen aktivierenden Effekt. So wurde deutlich, dass ABA3-NifS als funktionelle Domäne allein in der Lage ist, den Schwefel *in vitro* auf das Zielprotein AO zu übertragen.



**Abb. 2.13:** **AO-Aktivierung durch ABA3 und seine Domänen.** Je 1 µg inaktivierte AO wurde mit verschiedenen ABA3-Proteinen in Anwesenheit von 0,5 mM L-Cystein in 100 mM Tris, pH 9,3 für 1 h bei 37°C inkubiert. Die Färbung erfolgte mit Indol-3-Carboxaldehyd als Substrat für die AO. Die Kontrolle enthält nur inaktivierte AO.

Für die Proteinvarianten ABA3-NifS C430A sowie ABA3-NifS K271S konnte bereits eine erhebliche Funktionsbeeinträchtigung in den vorangehenden Aktivitätsnachweisen gezeigt werden. Nun sollten sie auch noch auf ihre Fähigkeit hin untersucht werden, inaktivierte AO zu reaktivieren. Dabei wurde deutlich, dass beide Varianten auch hier in ihrer Funktion eingeschränkt sind (Abb. 2.14). Im Vergleich zur Kontrolle ist nur eine minimale Steigerung der AO-Aktivität zu erkennen.



**Abb. 2.14:** **AO-Aktivierung durch ABA3-NifS-Varianten.** Die Protein-Variante ABA3-NifS C430A kann die partiell inaktivierte AO nur minimal reaktivieren. Bei ABA3-NifS K271S ist keine Steigerung der Aktivität zu erkennen.

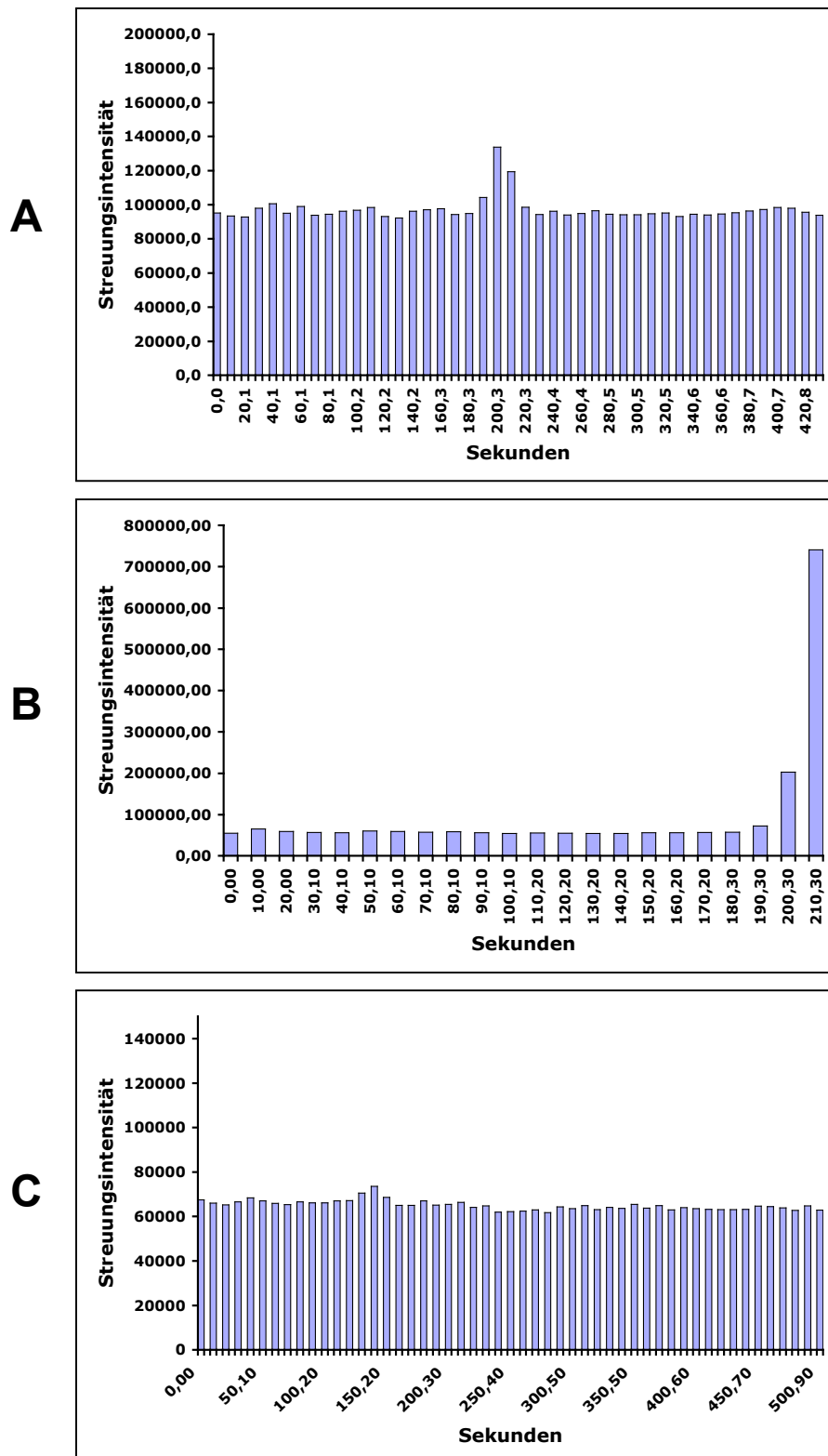
### 2.2.6 Interaktion zwischen ABA3-NifS und ABA3-CT

Wie Mutanten-Analysen eindeutig zeigten, ist die C-terminale Domäne von Moco-Sulfurasen *in vivo* essentiell an dem Mechanismus zur Moco-Sulfurierung beteiligt (Sagi *et al.*, 2002; Dai *et al.*, 2005). Es konnte andererseits gezeigt werden, dass ABA3-NifS allein sämtliche Funktionen besitzt, um den Schwefel aus L-Cystein zu mobilisieren und als Persulfid bereitzustellen. Die Wichtigkeit von ABA3-CT *in vivo* und die autonome Funktion der NH<sub>2</sub>-terminalen ABA3-Domäne als L-Cystein-Desulfurase lassen auf eine enge funktionelle Abhängigkeit der beiden Domänen im Mechanismus der Moco-Sulfurierung schließen. Diese funktionelle Abhängigkeit sollte anhand von Interaktionsstudien untermauert werden.

Die Gelfiltration als klassische Analysemethode zur Bestimmung von Protein-Protein-Wechselwirkungen brachte jedoch kein positives Ergebnis. Beide Proteine eluierten separat als Dimer (ABA3-NifS, 120 KDa) bzw. Monomer (ABA3-CT, 35 KDa). Diesem Ergebnis standen verschiedene Beobachtungen entgegen, die dennoch auf eine Interaktion hindeuten:

Die beim Umpuffern des ABA3-CT in Niedrigsalz-Puffer regelmäßig auftretende Präzipitation konnte durch die sofortige Zugabe von ABA3-NifS gestoppt und sogar rückgängig gemacht werden. Die zunächst trübe Lösung klärte sich innerhalb von Sekunden.

Um diesen Effekt von ABA3-NifS auf das Präzipitationsverhalten von ABA3-CT genauer zu studieren, wurden Dynamic-Light-Scattering-Experimente durchgeführt (Abb. 2.15). Anhand des reflektierten Lichts kann dabei auf die durchschnittliche Partikelgröße sowie die Homogenität einer Probe geschlossen werden. In drei separaten Ansätzen wurde das Aggregations-Verhalten von ABA3-NifS (A), ABA3-CT (B) und einer Mischung beider Proteine (C) im Vergleich untersucht. Die entsprechenden Proteinlösungen wurden in eine dafür vorgesehene Küvette überführt und in regelmäßigen Abständen vermessen. ABA3-NifS ist dabei selbst über einen relativ langen Zeitraum stabil. Sogar nach ca. 7 Minuten konnte noch keine Aggregatbildung beobachtet werden. ABA3-CT hingegen beginnt bereits nach ca. 180 Sekunden schnell zu aggregieren. Auch mit dem Auge erkennbar tritt in der Lösung ab diesem Zeitpunkt eine deutlich Trübung auf. Eine Mischung aus beiden Proteinen im äquimolaren Verhältnis hingegen zeigt auch nach über 7 Minuten keinerlei Aggregatbildung (C).



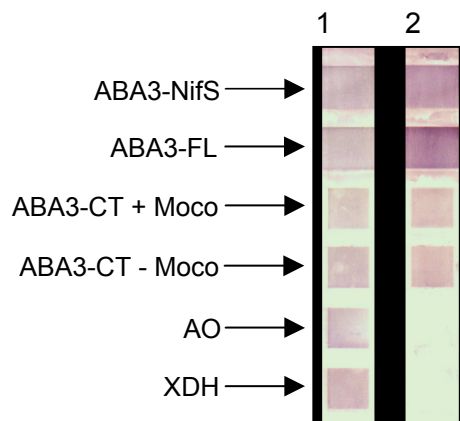
**Abb. 2.15: Dynamic Light Scattering.** (A) Das Protein ABA3-NifS ist über 400 Sekunden lang in der Probenküvette stabil. Es ist keine Aggregation zu Erkennen. (B) Der ABA3-CT ist für lediglich ca. 180 sec. stabil. Danach beginnt er sehr schnell Aggregate zu bilden. Die Streuungsintensität steigt dabei auf über 700,000 Einheiten. (C) In einer Mischung aus ABA3-NifS und ABA3-CT bleiben beide Proteine deutlich über 400 sec. stabil.

### 2.2.6.1 Slot-Blot-Analyse

Mit dieser Methode sollten die ersten Hinweise auf eine mögliche Interaktion von ABA3-NifS mit ABA3-CT gefestigt werden. Zudem sollte über die Variation der Interaktionsbedingungen eine Aussage über die Stärke sowie Art der Wechselwirkungen gemacht werden.

Unter Verwendung der Slot-Blot-Analyse können durch den Einsatz spezifischer Antikörper auch geringe Proteinmengen nachgewiesen werden. Zudem können die Parameter so optimiert werden, dass auch sehr schwache Wechselwirkungen nachgewiesen werden können.

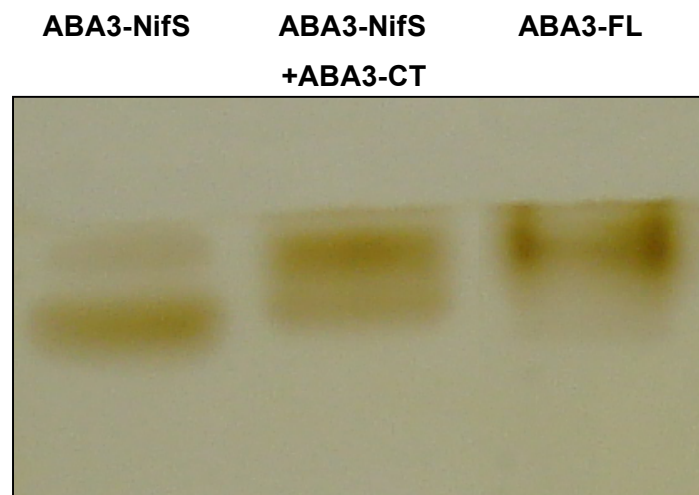
Um das Interaktionsverhalten der ABA3-Domänen auch unter Einbeziehung der Zielproteine AO und XDH zu verstehen, wurde die Bindung von ABA3-NifS sowohl an ABA3-CT als auch an AO und XDH analysiert (Abb. 2.16). Dabei kamen unterschiedlich stringente Waschbedingungen zum Einsatz. Es zeigte sich, dass nach sanftem dreimaligem Waschen mit TBS für jeweils 10 Minuten eine Interaktion sowohl mit ABA3-CT als auch mit AO und XDH nachweisbar ist (Spur 1). Wird der Blot intensiverem Waschen unterzogen (3 x TBSTXS für jeweils 10 Minuten) hat nur die Bindung an ABA3-CT Bestand (Spur 2). Dies untermauert die Annahme einer Wechselwirkung zwischen den beiden ABA3-Domänen.



**Abb. 2.16:** Interaktionsnachweis von ABA3-NifS mit ABA3-CT. Ein gegen ABA3-NifS gerichteter Antikörper erkennt die in der ersten Dimension aufgetragenen Proteine ABA3-NifS und ABA3-FL. (1) Unter sanften Waschbedingungen (TBS) kann eine Interaktion von ABA3-NifS, welches in der zweiten Dimension aufgetragen wurde, mit ABA3-CT aber auch mit AO und XDH festgestellt werden. (2) Unter stringenten Bedingungen (TBSTXS) bleibt ABA3-NifS lediglich an ABA3-CT gebunden. Dessen Moco-Saturierung macht dabei keinen Unterschied.

### 2.2.6.2 Bandenshift im nativen Gel

Das rekombinant exprimierte ABA3-NifS kann im nativen Gel über die Silbernitrat-Aktivitätsfärbung anhand seiner Aktivität verfolgt werden. Somit stellt diese Methode eine Möglichkeit dar, den Einfluss anderer Substanzen bzw. Proteine auf das Laufverhalten und die Aktivität dieses Proteins nachzuvollziehen. Bei der Inkubation von 50 µg ABA3-NifS mit 100 µg ABA3-CT für 1 Stunde bei 4°C und anschließender langsamen Auftrennung im nativen Gel war deutlich zu erkennen, dass ein Teil der NifS-Domäne mit geringerer Geschwindigkeit läuft als normal (Abb. 2.17). Dies ließ auf eine Interaktion zwischen ABA3-NifS und ABA3-CT schließen. In der Tat entsprach das Laufverhalten dieser Bande dem des rekombinant exprimierten ABA3-Full-Length-Proteins.



**Abb. 2.17:** **Shift der Aktivitätsbande im nativen Gel.** Bei der Aktivitätsfärbung von 50 µg ABA3-NifS kommt es nach der Inkubation mit ABA3-CT für 1 Stunde bei 4°C zu einem Shift der Aktivitäts-Bande. Die entstandene Bande hat dasselbe Laufverhalten wie ABA3-FL.

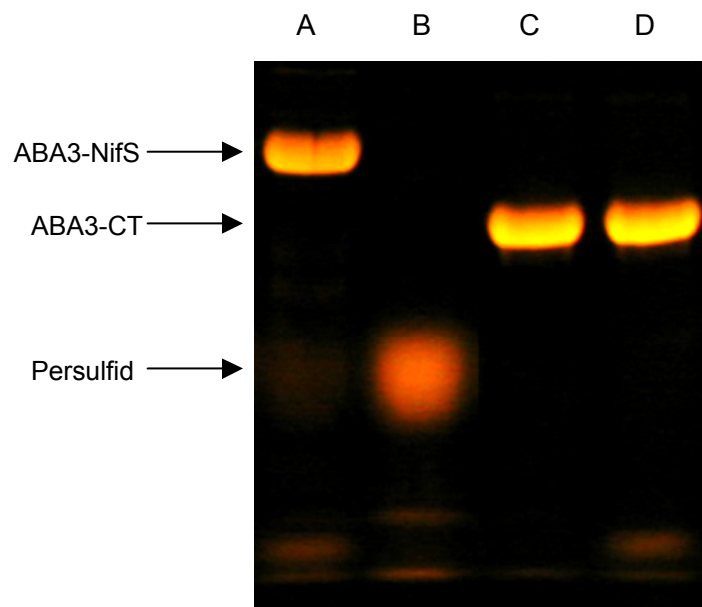
### 2.2.6.3 Übertragung des Schwefels

Die Funktion von ABA3-CT bei der Sulfurierung des Moco *in vivo* ist essentiell aber bislang unbekannt. Eine mögliche Beteiligung wäre in der Weiterleitung des Persulfid-Schwefels auf die Zielproteine zu sehen. Aus diesem Grund sollte überprüft werden, ob der Persulfid-Schwefel auf seinem Weg zum Moco zunächst von ABA3-NifS auf ABA3-CT übertragen wird

und hier weiterhin als Persulfid nachweisbar ist. Dieser Nachweis wurde mit Hilfe des 1,5-I-AEDANS-In-Gel-Assays durchgeführt.

Dazu wurde ABA3-NifS zunächst DTT-behandelt, um eine möglichst homogene Proteinpopulation zu erhalten. Das so behandelte Protein besitzt nahezu keine Persulfid-Liganden mehr (Abb. 2.18, A). Im Anschluss wurde ABA3-NifS mit L-Cystein inkubiert, um es vollständig mit Persulfid abzusättigen. Das überschüssige Substrat wurde anschließend über eine Nick-Säule entfernt. Das gebildete Persulfid ließ sich gut nachweisen (Abb. 2.18, B). Mit dem Erscheinen der Persulfidbande geht ein Verschwinden der Proteinfluoreszenz einher. Dies ist ein Beleg für die vollständige Saturierung des Proteins mit Persulfid, die effektive Abspaltung dieses Intermediats sowie die hohe Spezifität des 1,5-I-AEDANS für Thiolgruppen unter den gewählten Bedingungen.

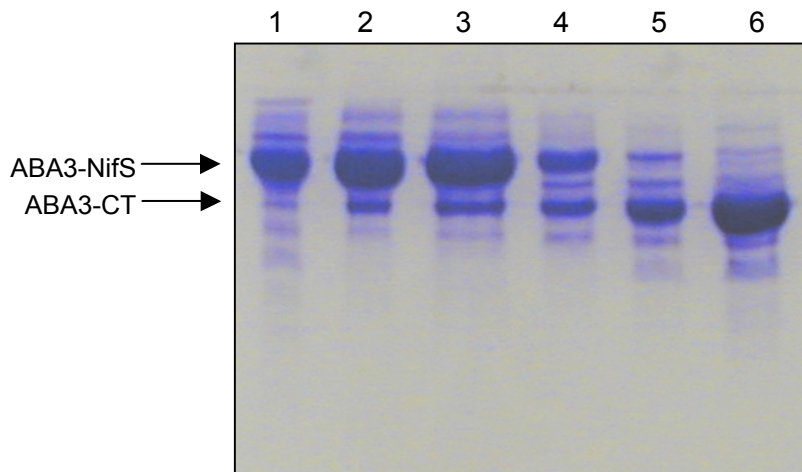
Sollte später ein Schwefel an ABA3-CT nachweisbar sein, musste der Ursprung des Schwefels eindeutig belegt werden. Aus diesem Grund wurden mit ABA3-CT Kontrollen erstellt. Um alle eventuell schon vorher gebundenen Persulfide zu entfernen, wurde auch dieses Protein zunächst DTT-behandelt. Das Gel zeigt, dass so vorbereitetes ABA3-CT keinerlei Persulfid gebunden hat (Abb. 2.18, C). Um auszuschließen, dass ABA3-CT in Anwesenheit von L-Cystein selber Persulfid synthetisieren kann, wurde ein entsprechender Kontrollansatz erstellt. Das Gel zeigt hier eindeutig, dass kein Persulfid gebildet wird (Abb. 2.18 D).



**Abb. 2.18:** **Persulfid-Beladung von ABA3-NifS und ABA3-CT.** (A) Das Protein ABA3-NifS trägt nach Behandlung mit DTT kaum noch Persulfid-Liganden. (B) Nach Inkubation mit L-Cystein ist ABA3-NifS mit Persulfid saturiert. (C) Auch ABA3-CT ist nach DTT-Behandlung vollkommen Persulfid-frei. (D) Die Inkubation mit L-Cystein führt nicht zur Bildung eines Persulfids.



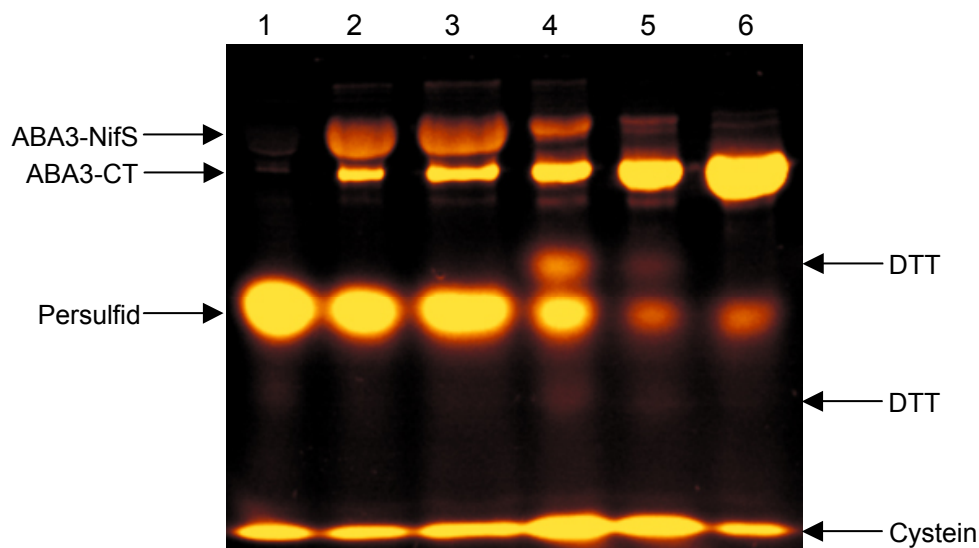
Um den Transfer des Schwefels zu ermöglichen, wurden 250 µg des Persulfid-beladenen ABA3-NifS mit 250 µg des Persulfid-freien ABA3-CT für 15 Stunden bei 4°C inkubiert. Die Trennung der Proteine erfolgte über Gelfiltration mit einer Superdex 200 30/10-Säule. Dabei konnte eine ABA3-CT-Fraktion gereinigt werden, die nur minimale Verunreinigung durch ABA3-NifS aufzuweisen hatte (Abb. 2.19).



**Abb. 2.19: Fraktionsanalyse nach Gelfiltration.** Das Coomassie-gefärbte Gel zeigt, dass die letzte Fraktion nur noch zu sehr geringen Teilen mit ABA3-NifS verunreinigt ist (6). Die Kontrolle in Spur 1 zeigt vergleichbare Mengen an ABA3-NifS wie die Spuren 2 und 3.

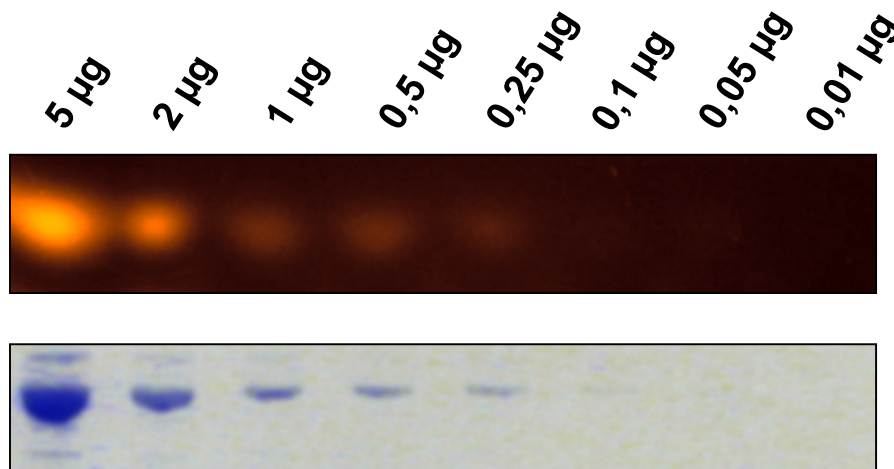
Um den Persulfid-Gehalt an ABA3-CT besser nachvollziehen zu können, wurden alle proteinhaltigen Fraktionen zur Analyse im 1,5-I-AEDANS-In-Gel-Assay aufgetragen (Abb. 2.20). Im Vergleich zu voll Persulfid-beladenem ABA3-NifS als Kontrolle (1) zeigte sich hierbei, dass nach Gelfiltration die Fluoreszenz der ABA3-NifS-Proteinbande zunimmt (2-4), was nur durch das Binden von 1,5-I-AEDANS an freie Cystein-Reste erklärt werden kann. Das zuvor voll Persulfid-abgesättigte Protein musste also zum Teil Persulfid abgegeben haben, um solche freien Reste zu exponieren.

Um eine Aussage über die Bindung eines Persulfids an ABA3-CT treffen zu können, sind die letzten beiden Proben relevant. Hier ist deutlich zu erkennen, dass die Verunreinigung des Proteins durch ABA3-NifS stark abnimmt, die Fluoreszenz der Persulfidbande aber leicht zunimmt (5 und 6). Dies korrespondiert mit der Zunahme der ABA3-CT-Menge. Das nachgewiesene Persulfid kann seinen Ursprung in Probe 6 also nur an diesem Protein haben.



**Abb. 2.20:** **Schwefelübertragung von ABA3-NifS auf ABA3-CT.** Persulfid-beladenes ABA3-NifS wurde mit Persulfid-freiem ABA3-CT inkubiert und mittels Gelfiltration separiert. (1) Die Kontrolle aus Persulfid-beladenem ABA3-NifS zeigt ein deutliches Persulfid-Signal, die Proteinbande fluoresziert kaum. (2-4) Nach Gelfiltration zeigt ABA3-NifS weiterhin ein Persulfid-Signal, aber die Fluoreszenz des Proteins hat zugenommen. (6) Der fast reine ABA3-CT zeigt nach Gelfiltration ebenfalls ein Persulfid-Signal. Die teilweise auftretenden zusätzlichen Banden können eindeutigen Reaktionsprodukten zugeordnet werden. So formt 1,5-I-AEDANS mit DTT und L-Cystein im Versuchsverlauf spezifische Reaktionsprodukte (Beschriftung rechts).

Um nachhaltig ausschließen zu können, dass die minimalen Mengen ABA3-NifS in Spur 6 für das Persulfid-Signal verantwortlich sind, wurde eine Verdünnungsreihe mit 5 - 0,01 µg vollständig Persulfid-beladenem ABA3-NifS erstellt und vergleichend im 1,5-I-AEDANS-In-Gel-Assay sowie im Coomassie-gefärbten Gel analysiert (Abb. 2.21). Dieser Versuch erlaubt außerdem eine Einschätzung der Sensitivität für die Persulfid-Detektion. Der Menge ABA3-NifS, die als Verunreinigung in Spur 6 der vorangehenden Gele (Abb. 2.19/20) mitläuft, kann die hier (Abb. 2.21) in Spur 5 aufgetragene Proteinmenge (0,25 µg) oder weniger zugeordnet werden. Die Fluoreszenzanalyse dieser Spur zeigt ein kaum wahrnehmbares und deutlich schwächeres Persulfid-Signal als im vorangehenden Gel zu sehen. Somit konnte mit diesem Versuch eindeutig der Transfer eines proteingebundenen Persulfids von ABA3-NifS auf ABA3-CT gezeigt werden.



**Abb. 2.21: Sensitivität des Persulfid-Nachweises.** Eine Verdünnungsreihe von Persulfid-saturiertem ABA3-NifS (5; 2; 1; 0,5; 0,25; 0,1; 0,05 und 0,01 µg) wurde zum Persulfid-Nachweis eingesetzt (oben). Die Coomassie-Färbung (unten) erlaubt eine Einschätzung der Proteinmengen in Abb. 2.20.

#### 2.2.6.4 Übertragung des Moco von ABA3-NifS auf ABA3-CT

Es konnte in dieser Arbeit erstmals die Übertragung des Persulfids von ABA3-NifS auf ABA3-CT *in vitro* gezeigt werden. In der Pflanze selbst muss dies nicht unbedingt der Fall sein. Daher wurde auch die Möglichkeit in Betracht gezogen, dass ein kompletter Moco in seiner sulfurierten bzw. unsulfurierten Form übertragen wird. In diesem Experiment sollte erstmals untersucht werden, ob ein Moco prinzipiell von ABA3-NifS auf die C-terminale ABA3-Domäne übertragen werden kann. Dazu wurde Moco-beladenes ABA3-NifS (6,44 pmol FormA / nmol Protein) mit Moco-freiem ABA3-CT für 30 min bei 22°C inkubiert und über eine Gelfiltration (Superdex 200pg) wieder separiert. Es konnten reine ABA3-CT-Fraktionen isoliert und auf ihren Moco-Gehalt hin untersucht werden. Dabei wurden 1,3 pmol FormA / nmol ABA3-CT bestimmt. Somit ist gezeigt, dass zumindest unter *in vitro*-Bedingungen ein Transfer von Moco zwischen den Domänen möglich ist.

### 2.2.7 Analyse von natürlichen Moco-Sulfurase-Mutanten

Um den Reaktionsmechanismus zur Schwefelmobilisierung durch Moco-Sulfurasen in seinen einzelnen Schritten zu verstehen, wurden artifizielle Mutationen in das Protein eingebaut. Dabei konzentrierte man sich auf konservierte Motive bzw. Aminosäuren, für die man eine Beteiligung an der Reaktion annahm. Diese Herangehensweise setzt gewisse Kenntnisse über das Protein und seine Funktion voraus.

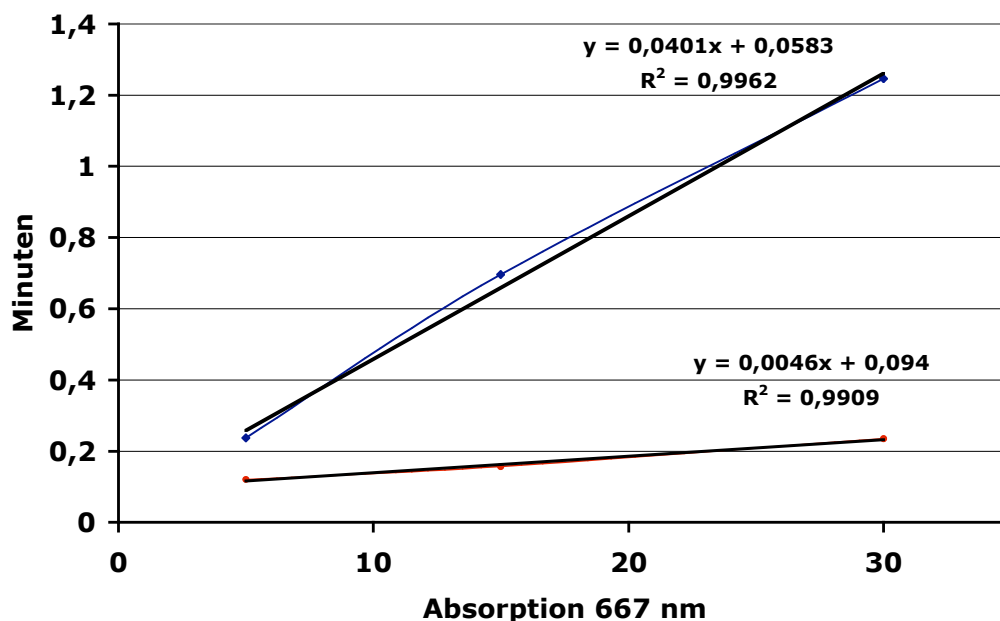
Einen alternativen bzw. ergänzenden Weg stellt die Analyse natürlich auftretender Mutationen dar. Solche Mutationen bleiben in der Regel unentdeckt, wenn die Funktion des Enzyms dadurch nicht oder nur unwesentlich eingeschränkt wird. Hat die Mutation aber einen Effekt auf die Aktivität des Proteins, entwickelt der Organismus einen typischen Phänotyp und kann so identifiziert werden. Gleichzeitig rückt diese Proteinvariante in das Interesse der Forschung. Hier gilt nun zu klären, welchen Einfluss die Mutation auf die Enzymfunktion hat und welche Einsichten dies in den Reaktionsablauf gewährt.

Im Rahmen dieser Arbeit sollten zwei Moco-Sulfurase-Varianten untersucht werden, die auf solche Mutationen natürlichen Ursprungs zurückgehen. Die Mutationen wurden dabei auf das rekombinant exprimierbare ABA3-NifS-Protein übertragen. Es handelt sich um die *aba3-1*-Mutation aus *A. thaliana* (Leon-Klosterziel *et al.*, 1996) und die T294I-Mutation aus *H. sapiens* (U. Finckh, pers. Mitteilung). Die Pflanzen mit der *aba3-1*-Mutation wurden anhand ihres deutlichen Phänotyps identifiziert, der sich durch einen reduzierten ABA-Gehalt sowie das Fehlen der AO- und XDH-Aktivität auszeichnet. Die Mutation des humanen Patienten wurde anhand des Krankheitsbildes der Xanthinurie Typ II entdeckt. Werden beide Mutationen auf das ABA3-NifS-Protein übertragen, ergeben sich die Proteinvarianten ABA3-NifS G469E (*aba3-1*) und ABA3-NifS T301I (T294I).

### 2.2.7.1 ABA3-NifS G469E

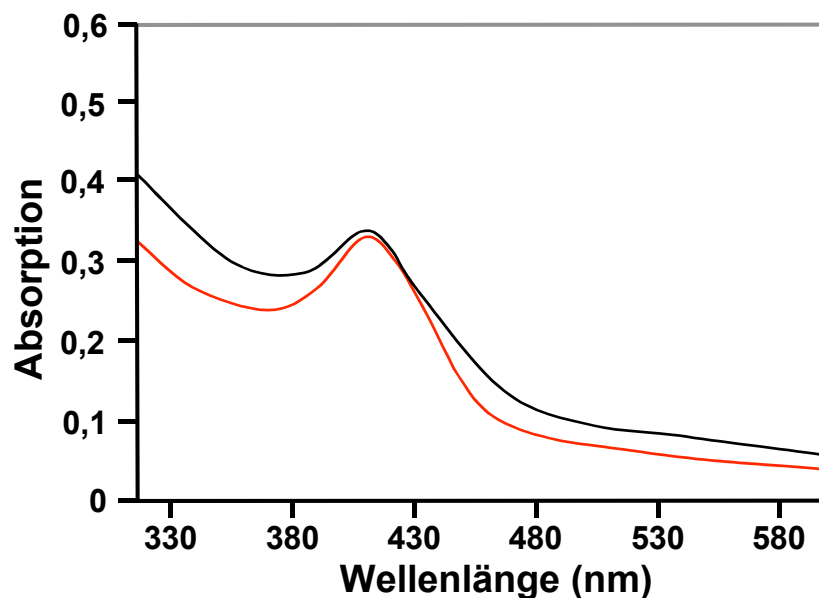
Bei dieser Proteinvariante wurde das Glycin an der Position 469 gegen ein Glutamat ausgetauscht. Der starke Phänotyp der *aba3-1*-Pflanzen legt nahe, dass entweder die Mobilisierung des Schwefels selbst oder aber dessen Übertragung auf die Zielproteine erheblich beeinträchtigt sein muss. Das Glycin liegt in relativer Nähe zum Cystein 430 des aktiven Zentrums, welches für die Bindung des Persulfids wichtig ist.

Ein erster Schritt zur Analyse der Mutation war daher, die Cystein-Desulfurase-Aktivität des mutagenisierten Proteins zu messen. Dazu wurde jeweils in Dreifachbestimmung nach 5, 15, 30 sowie 60 Minuten die gebildete H<sub>2</sub>S-Menge bestimmt. Aus der Steigung des erhaltenen Graphen konnte die Aktivität bestimmt und verglichen werden (Abb. 2.22). Dabei stellte sich heraus, dass das mutagenisierte Protein zwar prinzipiell noch den Schwefel aus Cystein mobilisieren kann, in seiner Reaktionsgeschwindigkeit aber stark eingeschränkt ist. Im Vergleich zum Wildtyp-Protein erreicht es nach 30minütiger Inkubation mit 0,5 mM Cystein in Anwesenheit von 1 mM DTT nur 11,5 % der WT-Aktivität.



**Abb. 2.22:** L-Cystein-Desulfurase-Aktivität von ABA3-NifS G469E. Die G469E-Mutation hat einen erheblichen Effekt auf die L-Cystein-Desulfurase-Aktivität. Die Protein-Variante erreicht nur ca. 11,5 % der Wildtyp-Aktivität.

Da der Cofaktor PLP ebenfalls essentiell für die Katalyse ist, wurde untersucht, ob das mutagenisierte Protein in seinem PLP-Gehalt bzw. dessen Koordinierung beeinträchtigt ist. Eine spektrale Untersuchung zeigte kaum Abweichungen vom WT-Spektrum (Abb. 2.23). Die Mutation scheint somit keinen Einfluss auf die PLP-Bindung zu nehmen. Daher ist der Verlust der Aktivität vermutlich auf strukturelle Veränderungen im aktiven Zentrum zurückzuführen.



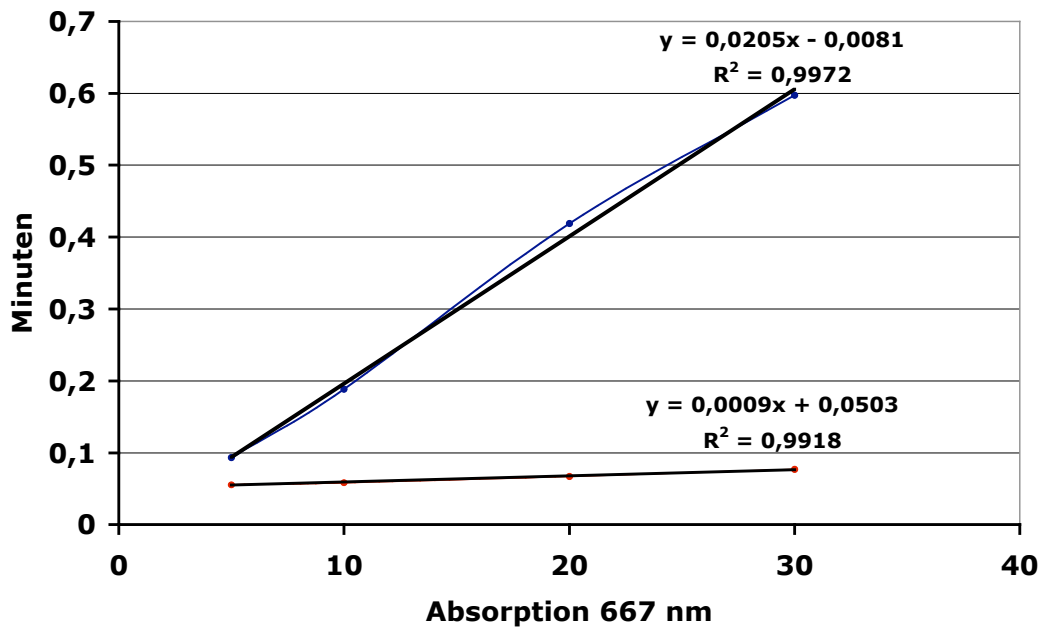
**Abb. 2.23:** Vergleich der Absorptionsspektren. Die ABA3-NifS G469E-Variante (rot) zeigt kaum Abweichungen im Absorptionsverhalten im Vergleich zum Wildtyp-Protein (schwarz).

Der Moco/MPT-Gehalt dieser Proteinvariante liegt bei ca. 3,34% und zeigt somit auch hier keine signifikanten Abweichungen vom Gehalt des Wildtyp-Proteins mit 5%.

#### 2.2.7.2 ABA3-NifS T301I

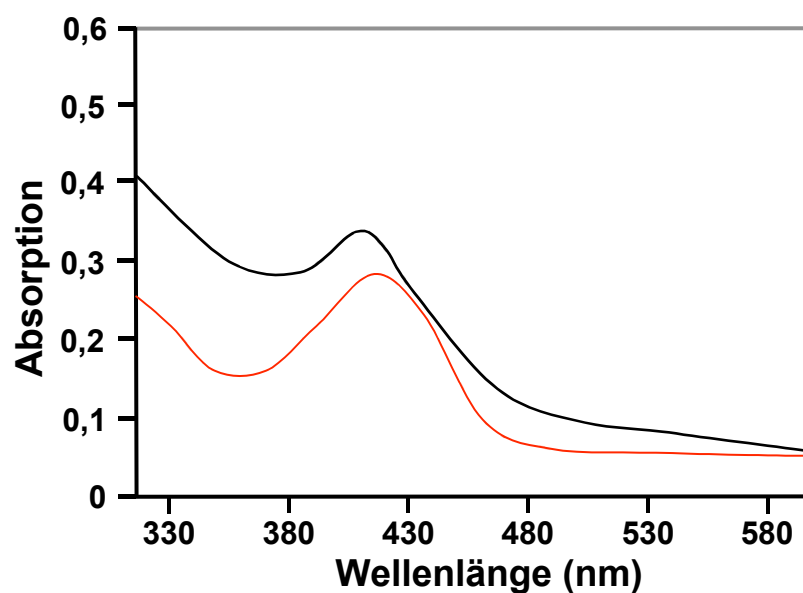
Aminosäure-Alignments zeigten, dass das Threonin an Position 294 des HMCS-Proteins seine Entsprechung in ABA3 an der Position 301 hat. Daher wurde diese Aminosäure gegen ein Isoleucin ausgetauscht, um die Mutation für ABA3 nachzustellen.

Die Messung der Aktivität des Proteins ergab auch hier eine starke Verminderung der Umsatzrate. Nach 30minütiger Inkubation erreichte die Aktivität von ABA3-NifS T301I nur 4,4% des WT-Wertes.



**Abb. 2.24:** L-Cystein-Desulfurase-Aktivität von ABA3-NifS T301I. Die T301I-Mutation hat einen erheblichen Effekt auf die L-Cystein-Desulfurase-Aktivität. Die Protein-Variante erreicht nur 4,4% der Wildtyp-Aktivität.

Die spektrale Untersuchung zeigt eine Abweichung im Absorptionsverhalten des PLP (Abb. 2.25). Die Analyse des Protein/PLP-Ratios ergab mit einem Wert von 10,1 eine Verringerung des PLP-Gehaltes. Der Wildtyp-Wert liegt bei ca. 7. Da die Mutation nahe an dem in HMCS für die PLP-Bindung essentiellen Lysin 296 liegt, ist das Tyrosin 301 vermutlich an der PLP-Bindung bzw. dessen Koordinierung beteiligt ist.



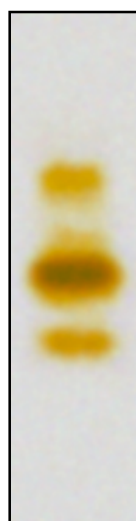
**Abb. 2.25:** Vergleich der Absorptionsspektren. Das Absorptionsverhalten der T301I-Variante (rot) weicht für den PLP-Peak von der Wildtyp-Form (schwarz) ab.

## 2.3 *In-vivo*-Analyse mit *A. thaliana* Pflanzenmaterial

### 2.3.1 Aktivitätsfärbung von *A. thaliana*-Rohextrakten

Die besten Ergebnisse für die Aktivitätsfärbung von Pflanzen-Rohextrakten wurden bei der Verwendung von frischem Pflanzenmaterial gemacht. Hierzu wurden ca. 0,06 g Blattmaterial von der Pflanze entnommen und mit 50 µl Probenpuffer (100 mM NaPi, pH 7,2) versetzt. Der Zellaufschluss erfolgte über Quetschen mit einem Eppidorn bei 4°C. Von diesen Extrakten wurden mindestens 100 µg Protein pro Tasche aufgetragen, wenn die Proteinkonzentration des Extraktes dies erlaubte. Dazu wurden die Proben mit nativem Ladepuffer versetzt. Die Auftrennung erfolgte im 10%igen Gel langsam bei 70 V für mindestens 3 Stunden. Die Auftrennung bei höheren Voltzahlen hat eine deutliche Reduktion der Aktivität zur Folge. Die Färbung erfolgte anschließend bei Raumtemperatur mit 10 mM DTT, 10 mM Cystein und 10 mM Silbernitrat in 100 mM Tris (ungepuffert) unter Schwenken für mehrere Stunden. Die Färbelösung muss unbedingt frisch angesetzt werden. Eine Silbernitrat-Stammlösung muss dabei in H<sub>2</sub>O angesetzt werden.

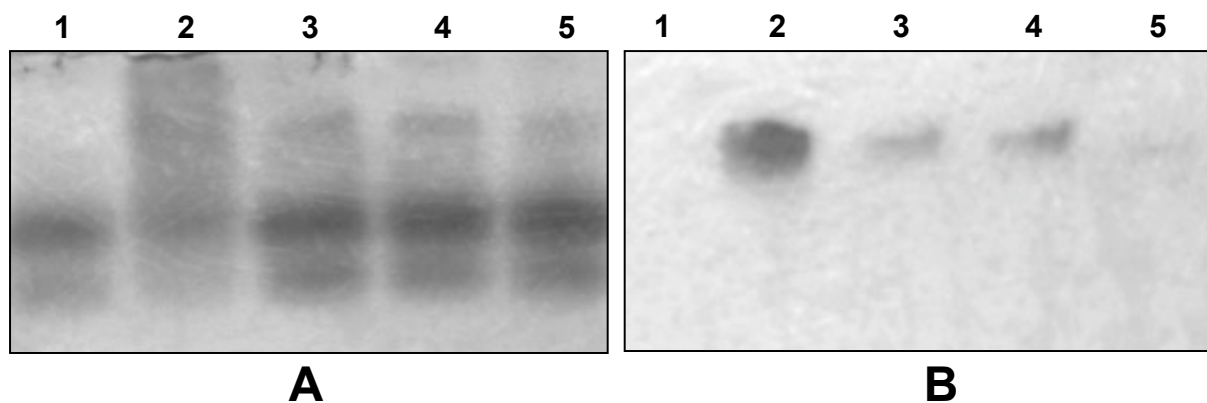
Bei der Aktivitätsfärbung der L-Cystein-Desulfurase-Aktivität eines *A. thaliana*-Rohextraktes aus Blattmaterial zeigten sich reproduzierbar, in Abhängigkeit von Alter und Zustand des Pflanzenmaterials in variierender Ausprägung, drei Banden (Abb. 2.26). Die Intensität der obersten Bande unterliegt dabei den stärksten Schwankungen. Während sie in jungem Pflanzenmaterial kaum vorhanden ist, kann sie in seneszentem und trocken-gestresstem Material die beiden anderen Banden an Intensität sogar übertreffen.



**Abb. 2.26:** L-Cystein-Desulfurase-Aktivität in *A. thaliana*-Rohextrakt. Ca. 140 µg eines *A. thaliana* Col-0 Extraktes aus frisch entnommenem Blattmaterial einer ca. sechs Wochen alten Pflanze wurde in einem 10%igen PA-Gel aufgetrennt und mit 10 mM DTT, 10 mM Cystein, 10 mM Silbernitrat in 100 mM Tris ungepuffert für 12 Stunden gefärbt.



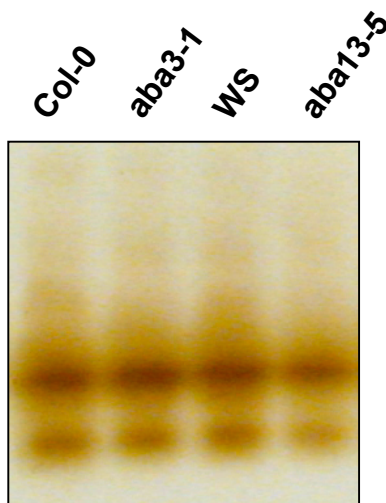
Analog zur Visualisierung der L-Cystein-Desulfurase-Aktivität kann mit Hilfe dieses Assays auch die L-Selenocystein-Lyase-Aktivität gemessen werden. Hierbei wird derselbe Färbemechanismus wirksam, nur dass sich anstelle von Silbersulfid Silberselelenid bildet. Bei dieser Färbemethode tritt in *A. thaliana*-Rohextrakten im Vergleich zu der Färbung mit L-Cystein zunächst nur eine Bande auf, welche mit der ABA3-Bande einer L-Cystein-Färbung übereinstimmt (Abb. 2.27). Die Färbung ist zudem erheblich schneller. Bereits nach 30 min ist ein deutliches Signal zu erkennen, während mit L-Cystein als Substrat in der Regel über Nacht gefärbt werden muss. Erst nach langer Färbedauer tritt in einigen Fällen auch mit L-Selenocystein eine zweite Bande hervor, welche etwa in Höhe der mittleren Bande einer entsprechenden L-Cystein-Färbung läuft. Auch bei der Färbung der L-Selenocystein-Lyase-Aktivität ist zu erkennen, dass das Signal im Fall von gestressten Pflanzen zunimmt (Abb. 2.27). Dabei wurden neben Trockenstress auch Salzstress und Behandlung mit ABA bzw. PEG analysiert.



**Abb. 2.27: Aktivitätsfärbung mit L-Selenocystein und L-Cystein als Substrate im Vergleich.** (A) Mit L-Cystein färben zwei bzw. alle drei Banden. Die Färbung fand über Nacht statt. (B) Mit L-Selenocystein als Substrat färbt nur die oberste der drei Banden. Die Färbedauer betrug hier ca. 30 min. Verglichen wurden hier jeweils: (1) Kontrollpflanze unbehandelt, (2) Trockenstress, (3) Salzstress, (4) ABA-Behandlung, (5) PEG-Behandlung

### 2.3.2 Der Vergleich von Wildtyp- mit Mutanten-Rohextrakten

Ein erster Vergleich von Wildtypmaterial mit den entsprechenden Mutanten wurde mit Extrakten aus Blattmaterial junger Pflanzen (ca. 3 Wochen) durchgeführt (Abb. 2.28). Gemessen wurde die L-Cystein-Desulfurase-Aktivität. Dabei zeigte sich, dass die früher zu beobachtende, oberste Bande fehlt bzw. deutlich schwächer ausgeprägt ist. Zwischen Wildtypen und Mutanten war kaum ein Unterschied im Bandenmuster oder in der Intensität der einzelnen Banden zu erkennen.

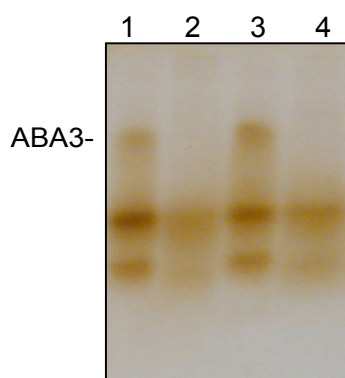


**Abb. 2.28: L-Cystein-Desulfurase-Aktivität in *aba3*-Mutanten.** Die Färbung der Extrakte von ca. drei Wochen alten Wildtyp-Pflanzen (Col-0; WS) im Vergleich zu den entsprechenden *aba3*-Mutanten *aba3-1* und *aba13-5* zeigt kaum Unterschiede im Bandenmuster.

### 2.3.2.1 Aktivitätsfärbung von gestresstem Material

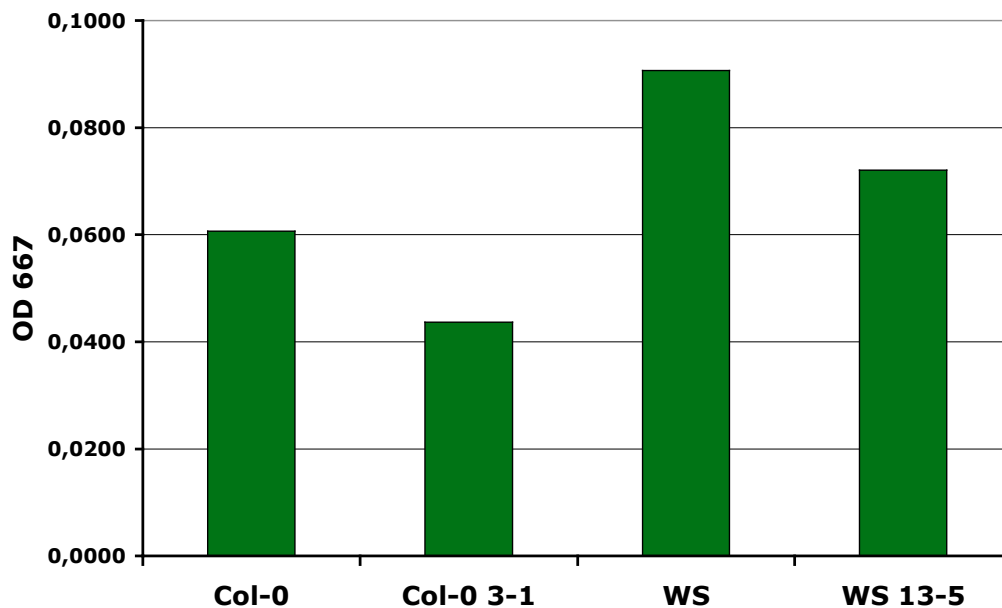
Da bekannt war, dass unter Trockenstress-Bedingungen die Transkription von *aba3* induziert wird, wurde die Aktivitätsfärbung mit entsprechend behandeltem Material wiederholt. Dazu wurde jeweils die gesamte Pflanze aus der Erde entfernt und für 48 Stunden in einer geschlossenen Petrischale im selben Tagesrhythmus belassen. Der Vergleich der aus diesen Pflanzen erstellten Extrakte zeigte deutlich, dass im Fall der Mutanten die oberste der drei typischen Aktivitätsbanden weiterhin fehlt (Abb. 2.29; 2 und 4). Im Fall der Wildtyp-Pflanzen konnte hier jedoch eine deutliche Zunahme der Bandenintensität beobachtet werden (Abb. 2.29; 1 und 3). Dies ließ den Schluss zu, dass es sich bei dieser Bande um ABA3 handelt. Bei den beiden anderen Banden handelt es sich vermutlich um die mitochondriale (ATNFS1) bzw. plastidäre (ATNFS2) L-Cystein-Desulfurase.

Die Abnahme der Intensität der beiden unteren Banden im Fall der Mutanten-Extrakte ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass diese Pflanzen aufgrund ihres Phänotyps deutlich stärker unter dem Trockenstress litten, als die Wildtypen.



**Abb. 2.29: L-Cystein-Desulfurase-Aktivität in gestressten *aba3*-Mutanten.** Die Färbung der Extrakte von ca. drei Wochen alten Pflanzen, welche für 48 Stunden einem Trockenstress ausgesetzt wurden, zeigt die Bildung der dritten Bande für die Wildtypen (1: Col-0; 2: WS). Bei den Mutanten fehlt diese Bande (2: *aba3-1*; 4: *aba13-5*).

Zusätzlich wurden die Extrakte auch auf ihre Gesamtaktivität hin untersucht. Dazu wurden jeweils 100 µg Gesamtrohextrakt im Methylenblau-Aktivitätsassay unter Standardbedingungen analysiert. Dabei wird die Reduktion der Gesamt-L-Cystein-Desulfurase-Aktivität in den *aba3*-Mutanten im Vergleich zu den korrespondierenden Wildtyp-Pflanzen deutlich (Abb. 2.30). Dies ist vermutlich auf das Fehlen der ABA3-Aktivität zurückzuführen.



**Abb. 2.30: Gesamt-L-Cystein-Desulfurase-Aktivität in Pflanzenrohextrakten.** Die Pflanzenrohextrakte wurden im Methylenblau-Aktivitätsassay auf ihre L-Cystein-Desulfurase-Aktivität hin untersucht. Hierbei zeigt sich eine Reduktion der Aktivität in *aba3*-Mutanten (3-1; 13-5) im Vergleich zu den korrespondierenden Wildtyp-Pflanzen (Col-0; WS).

## 2.4 Biochemische Erst-Charakterisierung von HMCS

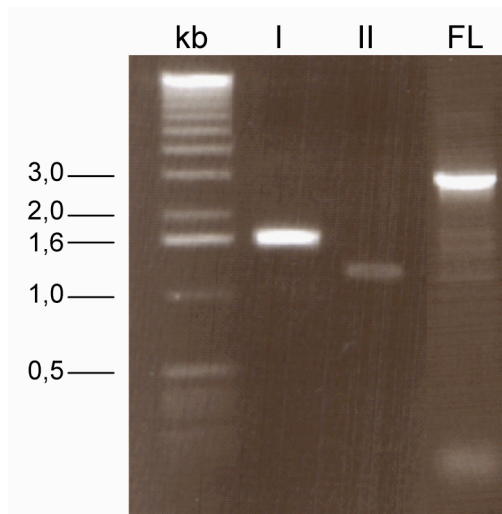
Im Rahmen dieser Arbeit sollte neben der Moco-Sulfurase ABA3 aus *A. thaliana* auch das humane Homolog (HMCS, GenBank Accession: AK000740) erstmals biochemisch charakterisiert werden. Auch dieses Protein verfügt über eine Zwei-Domänen-Struktur, die sich in eine NH<sub>2</sub>-terminal gelegene NifS-ähnliche und eine C-terminale Domäne gliedert, welche über einen 59 Aminosäuren langen Linker miteinander verbunden sind. Die Trennung der Domänen zur biochemischen Charakterisierung erfolgte dabei nach Analyse von Hydropathie-Plots und Homologien zu anderen Moco-Sulfurasen, vor allem ABA3 aus *A. thaliana*. Drei verschiedene Konstrukte wurden erstellt und zur Expression gebracht. Dabei handelt es sich um die 508 Aminosäuren lange NH<sub>2</sub>-terminale Domäne HMCS-NifS, HMCS-NifS + Linker und das vollständige HMCS-Protein (HMCS-FL) mit 888 Aminosäuren. Außerdem sollte in dieser Arbeit die Protein-Variante HMCS-NifS C424A hergestellt und analysiert werden, um die Bedeutung des konservierten Cystein-Rests für die von HMCS katalysierten Reaktionen zu zeigen.

### 2.4.1 Klonierung

Die für die Klonierungen notwendige *hmcs*-cDNA lag bereits vor. Sie enthielt im 5'-Bereich jedoch einige Fehler, welche im Rahmen der Herstellung des *hmcs-nifs*-Konstruktes eliminiert wurden. Das so erhaltene Fragment ist inklusive eines eingebrachten Stopp-Codons 1527 bp lang und wird durch zwei BamHI-Schnittstellen flankiert. Für die Expression des HMCS-NifS-Proteins wurde das Konstrukt über die BamHI-Schnittstellen in ein pQE80-Expressionsplasmid kloniert.

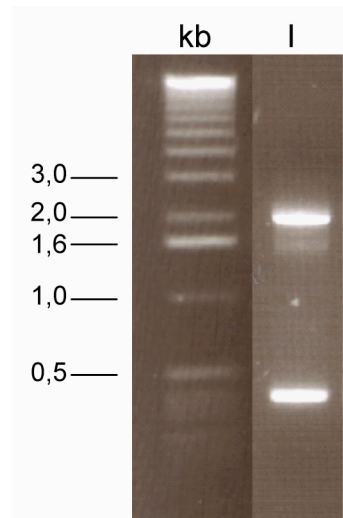
Auf der Basis der nun fehlerfreien *hmcs-nifs*-cDNA wurde mittels Fusions-PCR die komplette *hmcs*-cDNA hergestellt. Um die Fusion zu ermöglichen, wurde zunächst eine PCR mit dem *hmcs-nifS*-Konstrukt (1527 bp; in pBluescript II SK(+)) durchgeführt, um an dessen 3'-Ende das Stopp-Codon und die BamHI-Schnittstelle zu entfernen (Abb. 2.31; Fragment I). Dazu wurde der M13-Universal-Primer und der Primer HMCS\_NifS\_Fusion verwendet. Parallel wurde die von M. Oreb 2002 aus einer  $\lambda$ -Uni-ZAP-XR-Bank isolierte partielle *hmcs*-cDNA als Template verwendet, um den fehlerfreien Bereich des Linkers und des C-Terminus von HMCS zu generieren (Abb. 2.31; Fragment II). Die verwendeten Primer waren hierbei 1512+ (M. Oreb, Diplomarbeit, 2002) und HMCS-ct3'BamHI. So wurde ein PCR-Produkt hergestellt, das im 5'-Bereich mit dem *hmcs-nifS*-Fragment überlappt und hinter dessen Stopp-Codon eine BamHI-Schnittstelle eingefügt wurde. Bei der Fusion selbst wurden die Primer M13-

Universal und HMCS-ct3'BamHI verwendet. Die entstandene *hmcs-fl*-cDNA hat eine Größe von 2664 bp.



**Abb. 2.31: Kontrolle der Teilfragmente vor und nach Fusions-PCR.** Auf einem 1%igen Agarosegel wurden etwa 100 ng des nach PCR gereinigten Teilfragmentes, welches die NH<sub>2</sub>-terminale Domäne ohne Stoppcodon und BamHI-Schnittstelle repräsentiert (I) und etwa 30 ng des Teilfragmentes, welches den C-Terminus mit Stoppcodon und einer BamHI-Schnittstelle am 3'-Ende repräsentiert (II), aufgetragen. Beide Teilfragmente als Template in der Fusions-PCR ergaben ein ca. 3 kb großes Fusions-Produkt (FL).

Für die Klonierung von *hmcs-nifS*+*Linker* wurde mittels PCR gezielt der Bereich der NifS-Domäne zusammen mit der Linkerregion aus der pQE80/*hmcs-fl*-cDNA heraus amplifiziert, sowie ein terminales Stoppcodon und eine BamHI-Schnittstelle eingefügt. Es wurden die Primer pQEfor und HMCS-NifS\_Linker verwendet. Daraus ergibt sich ein 1704 bp großes Fragment für *hmcs-nifs* + *Linker* (Abb. 2.32).



**Abb. 2.32: Kontrollgel der PCR von *hmcs-nifS*+*Linker*.** Auf einem 1%igen Agarosegel wurden 25 µl DNA des PCR-Ansatzes aufgetragen. Die ca. 2 kb große Bande (I) beinhaltet die 1,7 kb des *hmcsS-nifS*+*Linker*-Fragmentes und eine pQE80-Restsequenz von ca. 300 bp, die durch den Einsatz des pQEfor-Primers entstand. Die ca. 400 bp große Bande ist ein unspezifisches Nebenprodukt.

#### **2.4.1.1 Herstellung von HMCS-NifS C424A**

In Analogie zu ABA3 sollte die Beteiligung eines streng konservierten Cystein-Rests an dem Reaktionsmechanismus untersucht werden. Für ABA3 konnte bereits die Wichtigkeit des Cysteins an Position 430 gezeigt werden. In HMCS findet sich dieser Aminosäure-Rest an Position 424 wieder. Unter Verwendung von *hmcs-nifs*-cDNA als Template und Mutagenese-Primern (C424A\_for; C424A\_rev) wurde durch PCR-Mutagenese ein Konstrukt erstellt, welches an dieser Position für ein Alanin kodiert.

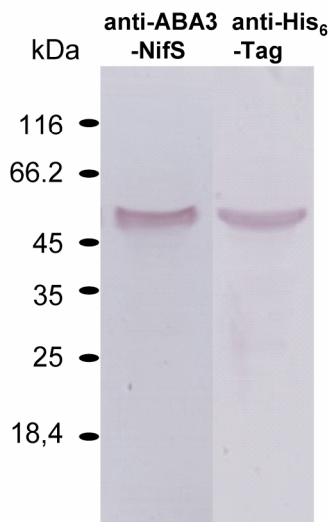
#### **2.4.2 Rekombinante Expression**

Um die optimalen Expressionsparameter für die verschiedenen Genprodukte zu ermitteln, wurden Expressionskinetiken durchgeführt. Unter allen getesteten Parametern wurde HMCS relativ schwach exprimiert und war nach Affinitätschromatographie immer noch stark verunreinigt. Das beste Ergebnis ergaben sich dabei für HMCS-NifS bei einem Zellwachstum bei 37°C für 6 h mit anschließender Induktion mit 10 µM IPTG bei 22°C für 20 h. Diese Parameter wurden für HMCS-NifS + Linker übernommen. Für HMCS-FL wurde bei sonst gleichen Parametern lediglich die IPTG-Menge auf 5 µM reduziert. Die mit einem His-Tag versehenen Proteine wurden über Nickel-NTA-Agarose aufgereinigt.

Selbst bei diesen weitestgehend optimierten Bedingungen betrug nach Affinitäts-Aufreinigung der Gehalt an HMCS lediglich ca. 10 % der Gesamtprotein-Menge des Eluats. Verunreinigungen bzw. unspezifisch aufgereinigte Proteine bildeten die restlichen 90 %. Um das HMCS-Protein in dem Eluat nachzuweisen, wurden die Eluatfraktionen im Western-Blot weiter analysiert.

### 2.4.2.1 Identifizierung von HMCS mittels Antikörper-Nachweis

HMCS-NifS zeigt auf Aminosäure-Ebene signifikante Homologien zu ABA3-NifS. Daher sollte der Nachweis von HMCS über anti-ABA3-NifS Antikörper versucht werden. In einem parallelen Ansatz wurde ein gegen den His-Tag gerichteter Antikörper verwendet. Der resultierende Western-Blot zeigt im Falle beider Antikörper eindeutig ein Signal bei ca. 56 kDa (Abb. 2.33). Dieses Ergebnis bestätigt die kalkulierte Größe des Proteins und erlaubt die Verwendung des anti-ABA3-NifS-Antikörpers auch für zukünftige Experimente.



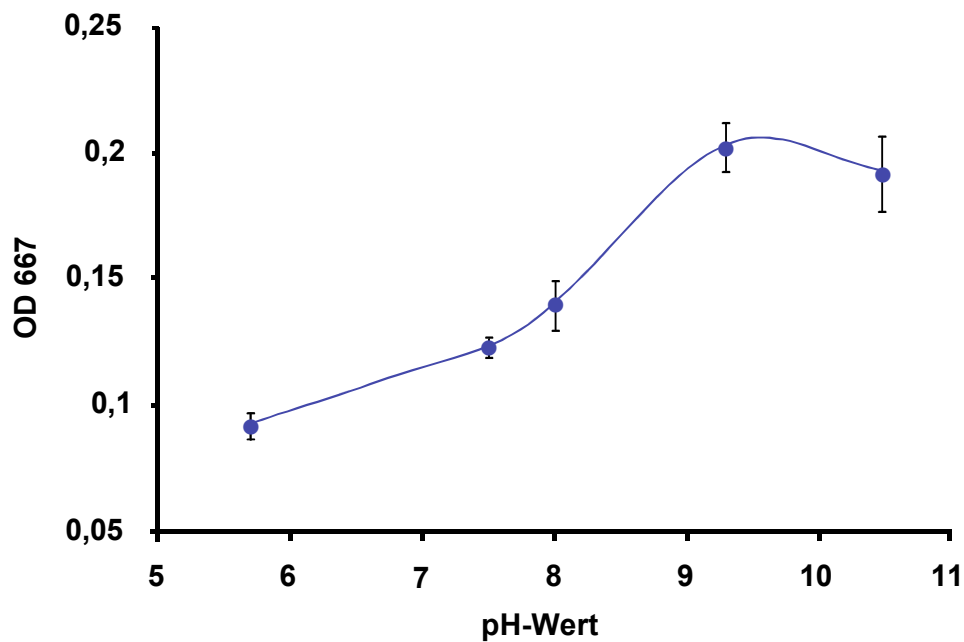
**Abb. 2.33:** **Nachweis von HMCS-NifS im Western-Blot.** HMCS NifS wird sowohl vom Anti-ABA3-NifS-Antikörper (1:7500; Kaninchen), als auch vom Anti-His-Antikörper (1:1000; Maus) spezifisch erkannt. Als Zweitantikörper wurde Ap-gekoppelter Anti-Kaninchen- (1:7500) bzw. Anti-Maus-Antikörper (1:3000) verwendet. Das Protein hat eine Größe von ca. 56 kDa.

### 2.4.3 Bestimmung der L-Cystein-Desulfurase-Aktivität von HMCS-NifS

Die zur Ermittlung der Aktivität von ABA3-NifS angewandten Methoden können auf HMCS übertragen werden. Die grundsätzlichen Messungen zur Bestimmung der Aktivität, besonders zur vergleichenden Analyse, erfolgten dabei mit Hilfe des Methylenblau-Aktivitätsassays. Zu beachten ist bei den folgenden Angaben, dass das Protein immer zu gewissen Teilen Verunreinigungen enthält. Daher beziehen sich die angegebenen Proteinmengen nicht auf HMCS direkt, sondern auf die gemessene Gesamtproteinmenge. Die optimalen Bedingungen für HMCS waren zwar nicht bekannt, die für ABA3 ermittelten Werte boten aber eine gute Ausgangsbasis für die Optimierung der Reaktionsparameter.

### 2.4.3.1 Bestimmung des pH-Optimums

Für ABA3-NifS war bekannt, dass die Umsatzgeschwindigkeit stark von dem gewählten pH-Wert des Ansatzes abhängt. Daher sollte auch HMCS-NifS auf sein pH-Optimum hin untersucht werden. Dazu wurden 25 µg Protein mit 0,5 mM Cystein und 2 mM DTT in 100 mM Tris des entsprechenden pH-Wertes für 1 h bei 37°C inkubiert. Dabei ergab sich ein Aktivitätsmaximum bei pH 9,3 (Abb. 2.34).



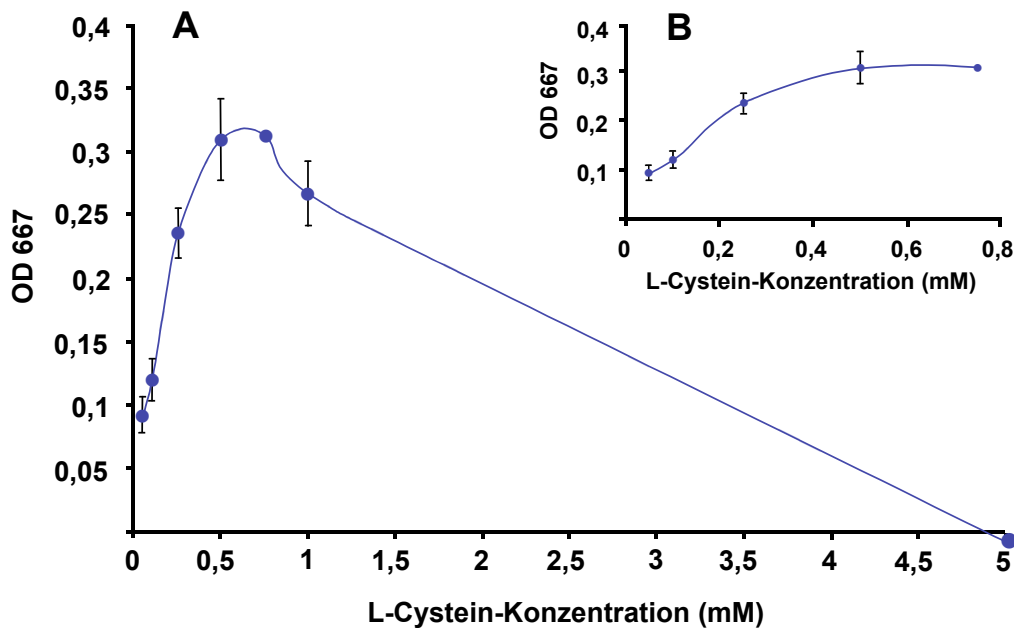
**Abb. 2.34:** Ermittlung des pH-Optimums für HMCS-NifS. HMCS-NifS wurde mit 0,5 mM Cystein und 2 mM DTT bei verschiedenen pH-Werten inkubiert. Anhand der Bestimmung des gebildeten H<sub>2</sub>S (Dreifachbestimmung) wurde die größte Aktivität bei einem pH von 9,3 gemessen.

### 2.4.3.2 Bestimmung der optimalen Substrat-Konzentration

Zur Ermittlung der optimalen Substratkonzentration wurden je 50 µg Protein mit 2 mM DTT und der entsprechenden L-Cystein-Menge in Dreifachbestimmung für je 15 min, 30 min und 60 min unter den als optimal ermittelten Bedingungen inkubiert. Die Aktivität wurde anhand des gebildeten H<sub>2</sub>S und einer Na<sub>2</sub>S-Standardreihe bestimmt. Dazu wurden die Mittelwerte für die jeweiligen Zeitpunkte gebildet und die Steigung berechnet. Anhand dieser Steigung kann der Zuwachs an H<sub>2</sub>S ermittelt werden. Getestet wurden Substratkonzentrationen bis 5 mM (Abb. 2.35; A). Die höchste Umsatzgeschwindigkeit konnte dabei für eine Konzentration von



0,5 mM L-Cystein bestimmt werden. Der Bereich bis 0,8 mM L-Cystein ist in Abb. 2.35 B vergrößert dargestellt.



**Abb. 2.35:** Ermittlung der optimalen Substrat-Konzentration für HMCS-NifS. (A) In einem Mix aus 50 µg HMCS-NifS und 2 mM DTT bei pH 9,3 wurden steigende L-Cystein-Konzentrationen bis 5 mM eingesetzt. Die H<sub>2</sub>S-Bestimmung erfolgte zu je drei Zeitpunkten (10, 30 und 60 min). Die daraus ermittelte Steigung gibt die Aktivität wieder. Sie ist bei 0,5 mM L-Cystein am höchsten. (B) Der Bereich bis 0,8 mM L-Cystein ist vergrößert dargestellt.

#### 2.4.3.3 K<sub>m</sub> und V<sub>max</sub> von HMCS-NifS für L-Cystein

Basierend auf den in 2.4.3.2 ermittelten Daten kann der vorläufige K<sub>m</sub>-Wert sowie V<sub>max</sub> von HMCS-NifS für das Substrat L-Cystein bestimmt werden. Dazu wurde die Darstellung nach Lineweaver-Burk gewählt, da sich aus dem resultierenden Graph sowohl der K<sub>m</sub>-Wert als auch V<sub>max</sub> leicht ermitteln lassen (Abb. 2.36). Dazu wird die reziproke Form der Michaelis-Menten-Gleichung angewandt.

Für den Graphen konnte folgende Geradengleichung ermittelt werden:

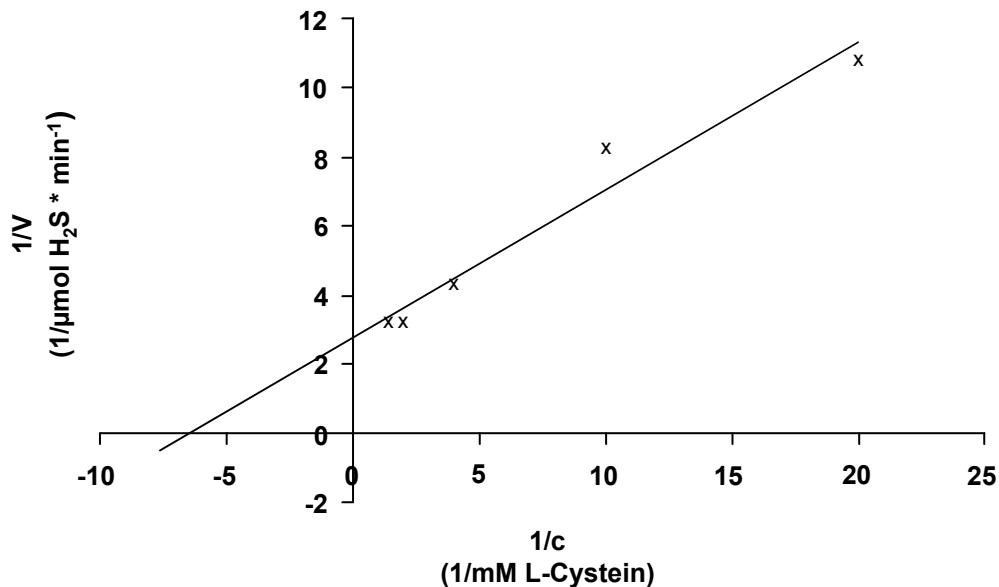
$$y = 0,4284 x + 2,7601$$

Für V<sub>max</sub> (mit V<sub>max</sub> = 1 / 2,7601) ergibt sich 0,362 µmol x min<sup>-1</sup> x 50 µg Protein<sup>-1</sup>

Daraus resultiert eine spezifische Aktivität von 1,165 x 10<sup>-4</sup> kat / g (Katal: kat = mol x s<sup>-1</sup>)

Für K<sub>m</sub> (mit K<sub>m</sub> = -1 / (0,4284 / 2,7601)) ergibt sich 0,155 mM L-Cystein

$$\frac{1}{v} = \left( \frac{K_M}{V_{\max}} \right) \times \frac{1}{S} + \frac{1}{V_{\max}}$$



**Abb. 2.36:** Darstellung der L-Cystein-Desulfurase-Aktivität nach Lineweaver Burk. In dieser Darstellungsform lassen sich  $V_{\max}$  und  $K_m$  direkt ablesen. Für  $V_{\max}$  ergibt sich ein Wert von  $0,362 \mu\text{mol} \times \text{min}^{-1} \times 50 \mu\text{g}^{-1}$  Protein. Der  $K_m$ -Wert beträgt  $0,155 \text{ mM}$  für L-Cystein.

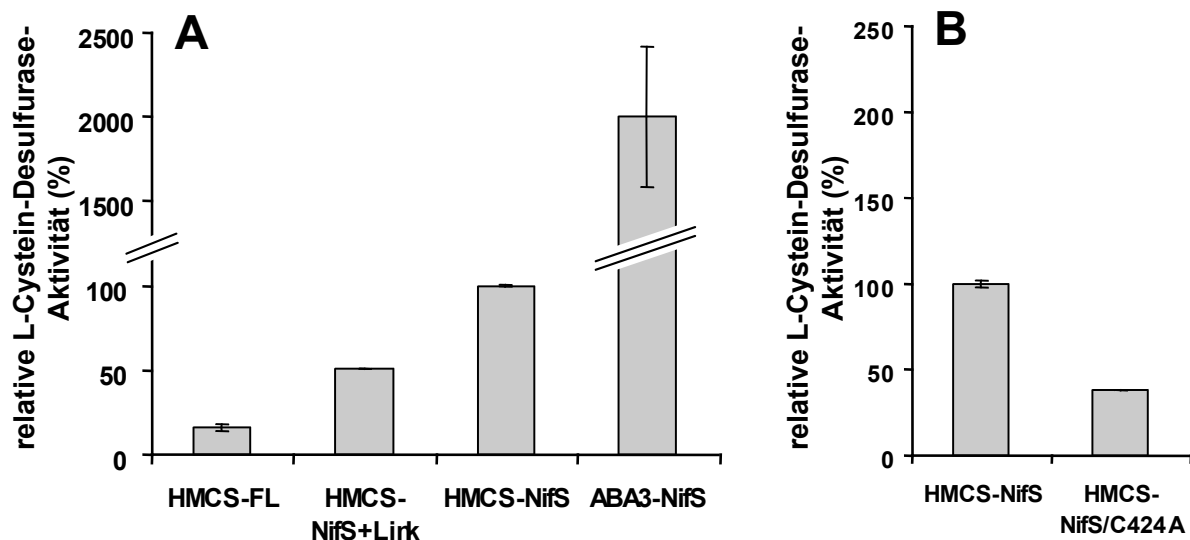
#### 2.4.4 Biochemische Eigenschaften der HMCS-Konstrukte im Vergleich

Neben HMCS-NifS sollten auch HMCS-NifS + Linker, HMCS-FL sowie die mutagenisierte Protein-Variante HMCS-NifS C424A auf ihre L-Cystein-Desulfurase-Aktivität sowie L-Selenocystein-Lyase-Aktivität hin untersucht werden. Hierbei stand nicht die Quantifizierung der Umsatzraten sondern der Vergleich der Proteine im Vordergrund. Dadurch sollte festgestellt werden, ob die Linker-Region bzw. auch die C-terminale HMCS-Domäne einen Einfluss auf die Aktivität von HMCS-NifS nimmt. Für den Cystein-Rest an Position 424 wurde aufgrund der Homologien zu NifS-Proteinen eine Beteiligung an dem Mechanismus vorhergesagt, die nun bestätigt werden sollte.

### 2.4.4.1 Die L-Cystein-Desulfurase-Aktivität

Die Bestimmung der L-Cystein-Desulfurase-Aktivität der verschiedenen HMCS-Proteine erfolgte über die Messung des gebildeten L-Alanins. Wie aus Abbildung 2.37 (A) hervorgeht, ist die Aktivität der HMCS-NifS-Probe ca. um Faktor 20 niedriger als von ABA3-NifS. Die Proteine HMCS-NifS + Linker und HMCS-FL zeigen eine noch geringere Aktivität und erreichen nur 50% bzw. 15% der Umsatzrate von HMCS-NifS.

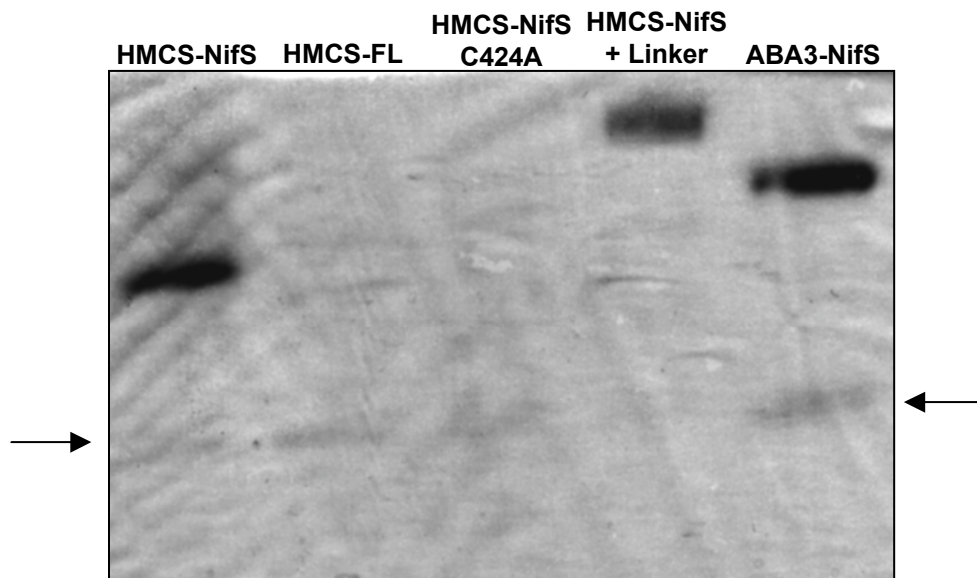
Für ABA3 konnte bereits eine Beteiligung des unter NifS-Proteinen konservierten Cystein-Rests an Position 430 am Reaktionsmechanismus gezeigt werden. Dieses Cystein hat in HMCS seine Entsprechung an Position 424. Der Austausch dieses Cysteins gegen ein Alanin hat eine deutliche Reduktion der L-Cystein-Desulfurase-Aktivität auf ca. 38% im Vergleich zur Wildtyp-Aktivität zur Folge (Abb. 2.37; B). Somit konnte auch für HMCS eine Beteiligung des konservierten Cystein-Rests an der L-Cystein-Desulfurierung gezeigt werden.



**Abb. 2.37: L-Cystein-Desulfurase-Aktivität der HMCS-Proteine.** (A) Die Aktivität von HMCS-NifS wurde auf 100% gesetzt. Sie ist um Faktor 20 kleiner als die von ABA3-NifS. HMCS-NifS + Linker und HMCS-FL weisen noch eingeschränkere Aktivitäten auf. Sie erreichen nur 50 % bzw. 15 % der HMCS-NifS-Aktivität. (B) Die Proteinvariante HMCS-NifS C424A ist ebenfalls in der Aktivität beeinträchtigt und erreicht nur 38 % der Wildtyp-Aktivität.

Ergänzend zu dieser Aktivitätsbestimmung wurden jeweils 100 µg der HMCS-Proteine auch zur Aktivitäts-Analyse im nativen Gel eingesetzt. Die Aktivitäten entsprechen in etwa den im L-Alanin-Assay gemessenen (Abb. 2.38). Zusätzlich kann eine Aussage über das Laufverhalten der verschiedenen Proteine gemacht werden. Zudem wird erst im Gel sichtbar,

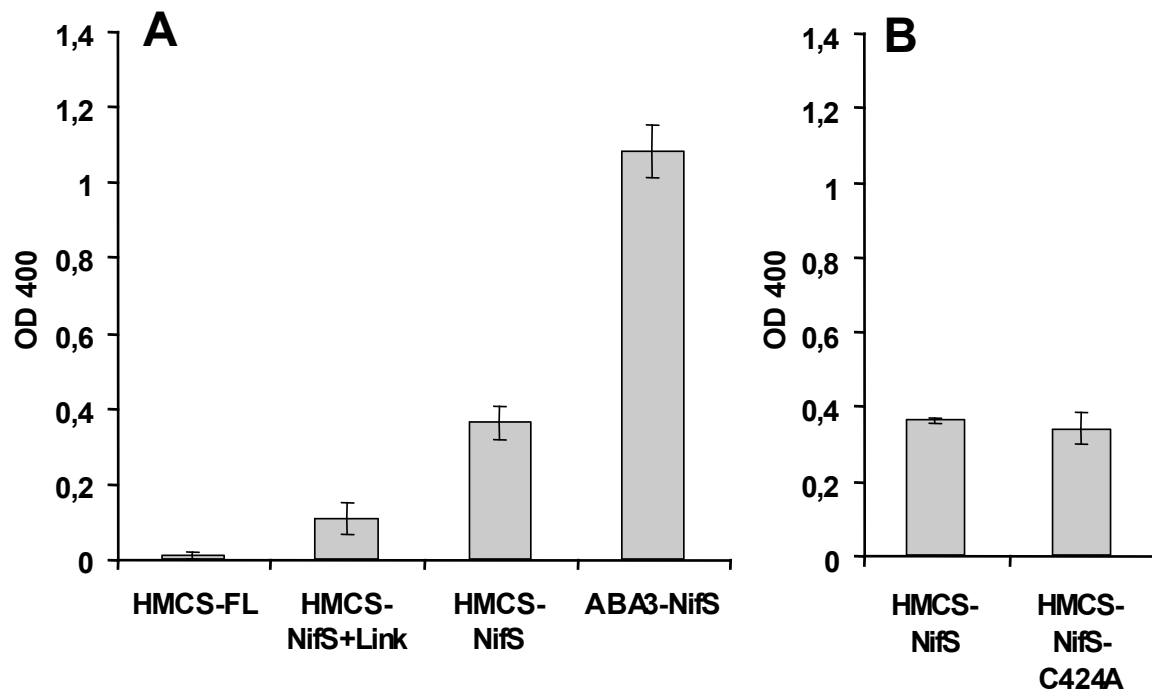
dass sich neben der jeweiligen Hauptbande eine zweite, deutlich schwächere Bande entwickelt (Abb. 2.38; Pfeil). Im Fall von HMCS-FL ist sogar nur diese Nebenbande zu erkennen. Es könnte sich um ein Spaltprodukt der NifS-ähnlichen Domäne handeln, da es in allen Spuren vorkommt und eine Restaktivität aufweist. Das HMCS-FL-Protein scheint selber keine Aktivität zu haben. Die zuvor gemessene Restaktivität von 15 % ist vermutlich ausschließlich auf die Nebenaktivität zurückzuführen.



**Abb. 2.38: L-Cystein-Desulfurase-Aktivität von HMCS im nativen Gel.** Jeweils 100 µg Protein wurden im 10%igen nativen PA-Gel aufgetrennt und auf L-Cystein-Desulfurase-Aktivität untersucht. Die Ergebnisse der Aktivitätsbestimmung aus dem vorangehenden Versuch können im Gel bestätigt werden. Eine zweite schwache Bande wird neben der jeweiligen Hauptbande sichtbar (Pfeil). Im Fall von HMCS-FL ist sogar nur diese Bande zu sehen.

#### 2.4.4.2 Die L-Selenocystein-Lyase-Aktivität

Die Bestimmung der L-Selenocysteine-Lyase-Aktivität erfolgte über die Bildung von Bleiselenid, welches bei 400 nm photometrisch vermessen wurde. Wie bei der Bestimmung der L-Cystein-Desulfurase-Aktivität sollten die verschiedenen HMCS-Proteine auch hier untereinander sowie mit ABA3-NifS verglichen werden (Abb. 2.39; A). Dabei ergab sich für HMCS-NifS eine Aktivität, die ca. um Faktor 3 geringer ist als jene von ABA3-NifS. Bezogen auf die Aktivität von HMCS-NifS erreichen HMCS-FL und HMCS-NifS + Linker nur 2,5% bzw. 28% der Umsatzrate. Der Austausch des Cystein-Rests an Aminosäure-Position 424 hat, im Gegensatz zur L-Cystein-Desulfurierung, keinen erkennbaren Einfluss auf die Fähigkeit des Proteins, L-Selenocystein als Substrat zu verstoffwechseln (Abb. 2.39; B).



**Abb. 2.39: L-Selenocystein-Lyase-Aktivität von HMCS.** (A) HMCS-NifS erreicht nur ca. ein Drittel des Umsatzes von ABA3-NifS mit L-Selenocystein als Substrat. Auch hier sind HMCS-FL und HMCS-NifS + Linker in ihrer Aktivität beeinträchtigt und erreichen nur 2,5 % bzw. 28 % der Aktivität von HMCS-NifS. (B) Die mutagenisierte Protein-Variante HMCS-NifS C424A ist nicht in ihrer Aktivität beeinträchtigt.

### 3. Diskussion

#### 3.1 Nutzbarmachung des Schwefels für den Organismus

Schwefel ist Bestandteil einer Vielzahl von Biomolekülen, denen er aufgrund seiner einzigartigen Eigenschaften ihre Funktion verleiht (zusammengefasst durch Kessler, 2006). So können seine chemischen Bindungen zum einen leicht gebildet und auch gespalten werden. Zum anderen kann der Schwefel sowohl als Elektrophil (z.B. als Disulfid) als auch als Nucleophil (z.B. als Thiol) fungieren (Beinert *et al.*, 2000a, b). Seinen Weg in den Stoffwechsel findet der Schwefel nach der Reduktion von verbreitet vorkommenden Sulfaten oder Polysulfiden als Sulfid. In dieser Form ist der Einbau in Cystein möglich, welches ein zentrales Schwefeldepot im Organismus für die Synthese von verschiedensten schwefelhaltigen Verbindungen darstellt. Bei der Verwertung des in Form von Cystein bereitgestellten Schwefels werden zwei unterschiedliche Strategien verfolgt. Entweder ein aktivierter Akzeptor geht die Verbindung mit dem Schwefel ein oder der Schwefel selbst wird aktiviert und kann so in neue Moleküle eingebaut werden. Bei dieser aktivierten Form des Schwefels spricht man von einem Persulfid. Maßgeblich an der Bildung von Persulfiden sind die so genannten Cystein-Desulfurasen beteiligt, welche über die direkte Verstoffwechselung von Cystein einen Zugang zu diesem Schwefeldepot schaffen. Eine der prominentesten Enzym-Klassen stellen dabei die NifS- bzw. NifS-ähnlichen Proteine dar.

In dieser Arbeit konnte unter anderem erstmals gezeigt werden, dass auch die Moco-Sulfurase ABA3 aus *A. thaliana* zu dieser Enzymfamilie gehört und somit eine wichtige Schlüsselstellung bei der Nutzbarmachung von Schwefel für bestimmte Stoffwechselprozesse einnimmt. In dem speziellen Fall von ABA3 erfüllt der Schwefel seine Funktion bei der post-translationalen Modifikation und damit einhergehenden Aktivierung der Enzyme der Xanthinoxidase-Familie.

#### 3.2 ABA3 im Kontext der L-Cystein-Desulfurasen

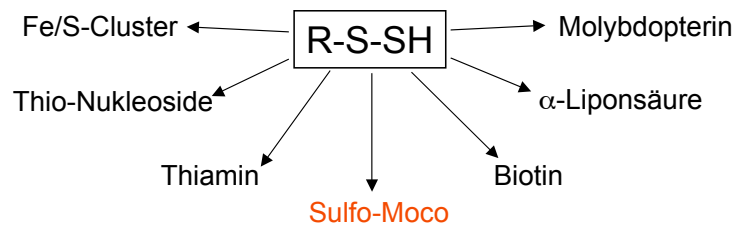
Im Jahr 1996 waren es Leon-Kloosterziel *et al.*, die bei der Analyse von ABA-defizienten *A. thaliana*-Mutanten den *aba3*-Locus zum ersten Mal beschrieben. Über seine Funktion war zu diesem Zeitpunkt jedoch noch nichts bekannt. Ein Jahr später konnte ihm durch Schwartz *et al.* (1997) im Rahmen einer ersten biochemischen Charakterisierung von pflanzlichen

Mutanten eine Beteiligung an der Sulfurierung des Moco von AO und XDH zugeordnet werden.

Das *aba3*-Gen wurde erstmals durch Bittner *et al.* (2001) kloniert, rekombinant exprimiert und das Genprodukt ABA3 grundlegend biochemisch charakterisiert. Dabei zeigte sich, dass ABA3 über eine L-Cystein-Desulfurase-Aktivität verfügt, welche in Anwesenheit von L-Cystein als Substrat anhand der Bildung von L-Alanin verfolgt werden konnte. Auch die für ABA3 postulierte physiologisch relevante Funktion der Moco-Sulfurierung konnte für das rekombinante Protein mit *in vitro*-Experimenten belegt werden. Zur genaueren Charakterisierung wurde, ebenfalls durch Bittner *et al.* (2001), die ABA3-Aminosäuresequenz mit den Sequenzen bekannter Moco-Sulfurasen anderer Organismen verglichen und zusätzlich einer computergestützten Signatur- und Funktionsanalyse unterzogen. Dabei wurde deutlich, dass alle Moco-Sulfurasen eine untereinander stark konservierte Struktur aufweisen. Die Homologien konzentrieren sich dabei auf die NH<sub>2</sub>-terminal gelegene Hälfte des Proteins und auf den C-terminalen Bereich. Diese Regionen großer Homologie werden von einem sehr schwach konservierten Bereich verbunden. Für das Protein wurde daher eine Zwei-Domänen-Struktur mit einer Linker-Region vorgeschlagen.

Weiterhin konnte für den NH<sub>2</sub>-terminalen Bereich von ABA3 signifikante Homologien zu Aminotransferasen der Klasse V nachgewiesen werden, zu denen unter anderem die NifS- bzw. NifS-ähnlichen Proteine gehören (im Folgenden zusammengefasst als NifS-Proteine).

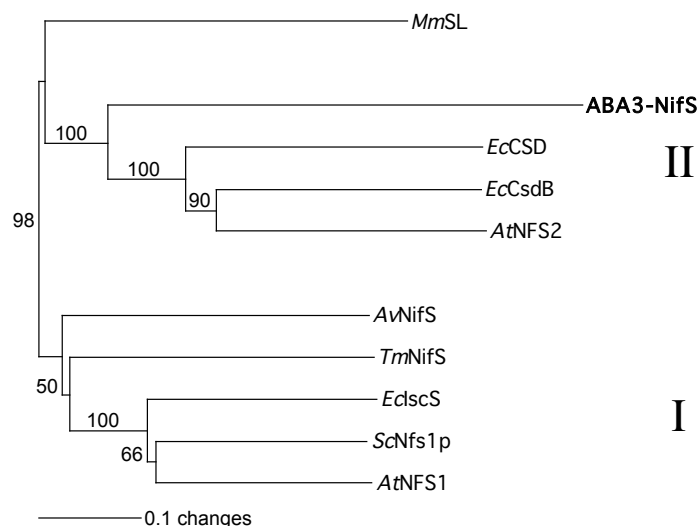
Bei diesen Proteinen handelt es sich um sog. L-Cystein-Desulfurasen, welche die Mobilisierung eines Schwefels aus L-Cystein unter gleichzeitiger Bildung von L-Alanin katalysieren. Der Schwefel wird dabei als Persulfid gebunden und für verschiedene Stoffwechselprozesse zur Verfügung gestellt (Abb. 3.1). Dazu zählt hauptsächlich die Synthese von Fe/S-Clustern (zusammengefasst durch Mihara & Esaki, 2002). Aber auch andere Stoffwechselprozesse wie z.B. die Thiamin-Synthese (Begley *et al.*, 1999),  $\alpha$ -Liponsäure-Synthese (Miller *et al.*, 2000; Ollagnier-de-Choudens *et al.*, 2000; Cicchillo *et al.*, 2004; Cicchillo & Booker, 2005), Biotin-Biosynthese (Jarrett, 2005; Lotierzo *et al.*, 2005) und MPT-Synthese (Leimkühler & Rajagopalan, 2001; Matthies *et al.*, 2004) sowie die Thiolisierung von tRNA (Lauhon & Kambampati, 2000; Lauhon, 2002) sind auf diesen Schwefel angewiesen. Mit der Identifizierung von ABA3 als NifS-Protein der Klasse II wird diese vielseitige Anwendung des Persulfid-Schwefels noch durch den Mechanismus der Moco-Sulfurierung ergänzt.



**Abb. 3.1:** Schwefelverbindungen, welche von einem Persulfid-Schwefel als Schwefelquelle abhängig sind (modifiziert nach Kessler, 2006).

Neben der L-Cystein-Desulfurase-Aktivität weisen die NifS-Proteine in variierender Ausprägung auch eine L-Selenocystein-Lyase-Aktivität auf, über deren physiologische Bedeutung jedoch noch keine gesicherten Erkenntnisse vorliegen (Mihara *et al.*, 1999; Mihara *et al.*, 2000b).

NifS-Proteine gruppieren sich in zwei Klassen, wobei die Enzyme des NifS/IscS-Typs zur Klasse I gehören. Enzyme des SufS-Typs bilden die Klasse II (Mihara *et al.*, 1997). Zwischen den Proteinen beider Klassen bestehen signifikante Unterschiede in der Aminosäuresequenz, was die phylogenetische Einordnung erlaubt (Abb. 3.2). Während die Proteine des Typs I relativ homolog zueinander sind, sind die Enzyme des Typs II deutlich divergenter. Zu ihnen gehört auch ABA3.



**Abb. 3.2:** Phylogenetische Gruppierung der NifS-Proteine. ABA3-NifS kann aufgrund von Aminosäuresequenz-Vergleichen eindeutig den L-Cystein-Desulfurasen des Typs II zugeordnet werden: EcCSD, EcCsdB = CSD und SufS aus *Escherichia coli*, AtNFS2 = SufS aus *A. thaliana*-Plastiden, MmSL = Maus Selenocystein-Lyase. Proteine des NifS/IscS-Typs gruppieren in Klasse I: AvNifS, TmNifS, ScNfs1p, AtNFS1 = NifS aus *Azotobacter vinelandii*, *Thermotoga maritima*, *Saccharomyces cerevisiae* und *A. thaliana*-Mitochondrien; EcIscS = IscS aus *E. coli*.



Für die zum Teil bereits gut charakterisierten NifS-Proteine ist der Mechanismus zur Schwefelmobilisierung weitestgehend geklärt. An ihm sind zwei unter allen NifS-Proteinen stark konservierte Motive beteiligt: Ein Pyridoxalphosphat (PLP)-Bindemotiv mit einem strikt konservierten Lysin-Rest sowie ein Persulfid-Bindemotiv mit einem ebenfalls strikt konservierten Cystein-Rest. Beide Motive finden sich auch in allen Moco-Sulfurasen wieder, was den Eindruck einer den NifS-Proteinen analogen Funktion bestärkt.

Die für ABA3 beschriebenen Sequenz-Homologien zu NifS-Proteinen beschränken sich ausschließlich auf die NH<sub>2</sub>-terminale Domäne. In Verbindung mit der für ABA3 gezeigten NifS-typischen L-Cystein-Desulfurase-Aktivität wurde daher angenommen, dass sich ABA3 nicht nur strukturell, sondern auch funktionell in zwei unterschiedliche Domänen teilt. Für die NH<sub>2</sub>-terminale Domäne wurde die Funktion einer NifS-ähnlichen L-Cystein-Desulfurase (ABA3-NifS), für die C-terminale Domäne (ABA3-CT) eine Funktion bei der Erkennung der Zielproteine AO und XDH postuliert (Amrani *et al.*, 2000; Bittner *et al.*, 2001).

### 3.3 Die Analyse der einzelnen ABA3-Domänen

Um die beiden ABA3-Domänen getrennt voneinander auf ihre spezifischen Eigenschaften hin untersuchen zu können, wurde die Expression der einzelnen Domänen über die Erstellung zweier separater *aba3*-Expressions-Konstrukte vorbereitet. Der Umfang der NH<sub>2</sub>-terminalen Domäne wurde dabei basierend auf Alignments von ABA3 mit verschiedenen NifS-Proteinen festgelegt. Mit den separat hergestellten Domänen konnte nun untersucht werden, welche eigenständige Funktion ihnen im Mechanismus der Moco-Sulfurierung zukommt und welche Reaktionsschritte andererseits das Zusammenwirken beider Domänen voraussetzen.

Ein Schwerpunkt dieser Arbeit lag auf der biochemischen Untersuchung von ABA3-NifS und der damit verbundenen Analyse des Reaktionsmechanismus zur Schwefelmobilisierung. Die Kern-Fragestellung, ob ABA3 den Schwefel dabei nach ähnlichen oder gleichen Mechanismen mobilisiert wie NifS-Proteine, wurde durch den konsequenten Vergleich neuer Erkenntnisse über ABA3-NifS mit den bereits gut beschriebenen NifS-Proteinen geklärt.

Zudem war die Untersuchung des funktionellen Zusammenspiels beider ABA3-Domänen Teil dieser Arbeit. Dafür wurden neue Erkenntnisse über den Weg des Schwefels von ABA3-NifS bis zum Empfängerprotein (AO/XDH) gewonnen.

### 3.4 Methodik

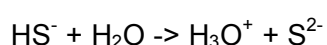
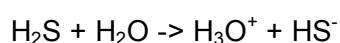
#### 3.4.1 Methylenblau-Aktivitätsassay

Dieser Assay erlaubt die schnelle Analyse verschiedener Proben in Bezug auf ihre L-Cystein-Desulfurase-Aktivität. Dabei steht die vergleichende Betrachtung mehrerer Proben im Vordergrund, da die Quantifizierung nur in einem begrenzten Rahmen möglich ist. Der Methylenblau-Aktivitätsassay stellt eine effizient Alternative zur L-Alanin-Bestimmung dar. Der wesentliche Nachteil des L-Alanin-Assays besteht darin, dass er aufgrund des komplexen Reaktionsablaufes und der Art der Messung, die ein gutes Timing erfordert, störanfällig ist. Zudem nimmt die Probenvorbereitung relativ viel Zeit in Anspruch, was die Vermessung vieler Proben, z.B. einer Kinetik, unpraktikabel macht.

Der Nachweis der L-Cystein-Desulfurase-Aktivität mit dem Methylenblau-Aktivitätsassay beruht auf der Bestimmung des freigesetzten  $\text{H}_2\text{S}$ . Dieses entsteht, wenn L-Cystein zu L-Alanin und einem proteingebundenen Persulfid umgewandelt wird, welches in Anwesenheit von DTT als  $\text{H}_2\text{S}$  das Protein verlässt. Der Färbemechanismus umfasst die Vorfixierung des Schwefels durch Zinkacetat als Zinksulfid, anschließender Reaktion mit saurem DMPD zu Leukomethylenblau mit abschließender Oxidation durch  $\text{Fe}^{3+}$  zu Methylenblau (Fogo & Popowsky, 1949). Auch zur Bestimmung des terminalen Moco-Schwefels wurde dieser Mechanismus schon angewendet (Tonsager & Averill, 1980; Wahl & Rajagopalan, 1982).

Die Schwierigkeit bei der Optimierung dieses Assays lag in der reaktiven und flüchtigen Natur des  $\text{H}_2\text{S}$ . Das  $\text{H}_2\text{S}$  muss für den Nachweis zunächst in einem Synthese-Schritt in detektierbaren Mengen hergestellt werden, bevor die Reaktion durch die Zugabe von Zinkacetat abgestoppt wird. Die Dauer dieser Synthese-Phase ist von entscheidender Bedeutung für die Färbefeffizienz. Je länger sie andauert, umso mehr  $\text{H}_2\text{S}$  kann im Rahmen der enzymatischen Reaktion hergestellt werden. Dies spricht zunächst für längere Inkubationszeiten. Der Nachteil aber ist, dass während dieser Synthese bereits vorhandenes  $\text{H}_2\text{S}$  aus dem Ansatz in die Gasphase verloren geht oder zu nicht detektierbaren Verbindungen weiterreagiert.

Die Reaktion des  $\text{H}_2\text{S}$  in wässriger Lösung als schwache zweibasige Säure kann nach folgender Formel dargestellt werden:



Der Schwefel in Form von  $S^{2-}$  ist in diesem Assay nicht nachzuweisen.

Bei Inkubationszeiten bis ca. 3 h überwiegt jedoch der Effekt des Ausgasens. Er kann durch die Wahl des Flüssigkeits- sowie des vorhandenen Gasvolumens im Reaktionsgefäß deutlich beeinflusst werden. Bei sehr langen Reaktionszeiten ist auch bei vollkommen luftdicht verschlossenen Reaktionsgefäßen kaum Färbung zu erwarten, da hier vermutlich das  $H_2S$  gänzlich zu  $S^{2-}$  abreagiert ist.

Diese beiden Effekte erschweren die Quantifizierung der Enzymaktivität. Bei relativ kurzen Reaktionszeiten von unter 1 h und gering gehaltenem Gasvolumen sind die Beeinträchtigungen aber vernachlässigbar und die Quantifizierung anhand eines  $Na_2S$ -Standards unter Billigung geringer Ungenauigkeiten möglich. Erwähnt werden muss hierbei, dass die zugrunde liegende reduktive Spaltung des Persulfids eine unphysiologische Reaktion darstellt und nichts über die tatsächliche Geschwindigkeit der Schwefelmobilisierung- und Übertragung *in vivo* aussagt. Eine Bestimmung der Umsatzgeschwindigkeit besitzt unter diesen Voraussetzungen somit in jedem Fall nur eine begrenzte Aussagekraft.

Der wesentliche Vorteil dieses Assays ist die Möglichkeit der schnellen, vergleichenden Analyse vieler Proben. Das entstehende  $H_2S$  wird direkt und nicht wie bei der L-Alanin-Bestimmung in mehreren aufeinander folgenden enzymatischen Reaktionen gemessen. Die Färbereaktionen selber laufen zudem ebenfalls schnell ab. In der Probe verbleibendes Protein stört die Färbung nicht, was die Abtrennung der niedermolekularen Fraktion wie beim L-Alanin-Assay überflüssig macht.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass erst der optimierte Methylenblau-Assay es ermöglichte, eine Vielzahl an Proben schnell, effizient und mit hoher Reproduzierbarkeit auf ihre L-Cystein-Desulfurase-Aktivität hin zu untersuchen

### 3.4.2 Silbersulfid-Aktivitätsassay

Vor der Entwicklung dieses Assays war es nicht möglich, einzelne L-Cystein-Desulfurasen in einem komplexen Gemisch vieler Proteine wie z.B. einem Rohextrakt mit vertretbarem Aufwand nachzuweisen bzw. ihre Aktivität zu bestimmen. Der Schlüssel zur Anwendung dieses Assays liegt in dem Färbemechanismus, welcher es erlaubt, das gebildete und als  $\text{H}_2\text{S}$  freigesetzte Persulfid (bzw.  $\text{H}_2\text{Se}$ ) bei noch andauernder Synthese in Form eines unlöslichen Farbstoffs zu binden und so nachzuweisen. Dieser Mechanismus kann daher mit der Auftrennung der Proteine in einem nativen Poly-Acrylamid-Gel kombiniert werden, was erstmals die Unterscheidung mehrerer L-Cystein-Desulfurasen in einer Probe anhand ihrer Aktivität möglich macht.

Der Assay ist für den qualitativen und semiquantitativen Nachweis dieser Enzymaktivität geeignet. Unter den bislang als optimal ermittelten Bedingungen bilden sich jedoch diffuse Banden, deren Intensität ersten Versuchen nach nicht in Relation zur eingesetzten Proteinmenge steht. Eingesetzt wurde er für den Nachweis von ABA3 in Rohextrakten aus *Arabidopsis thaliana*.

Der Assay verlangt keine aufwändige Probenaufarbeitung. Lediglich die Erstellung eines nativen Rohextraktes mit anschließender Auftrennung in einem nativen PA-Gel ist nötig. Dies erlaubt den schnellen Vergleich vieler Proben. Dabei kann erstmals die L-Cystein-Desulfurase-Aktivität in direktem Bezug zu verschiedenen Bedingungen wie z.B. Alter der Pflanze, Stressbedingungen, Mutationen, oder verschiedene Gewebe analysiert werden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, wie wichtig es ist, Daten über das native Protein zu erhalten. Zwar geben Erkenntnisse, welche an rekombinant exprimiertem Protein gewonnen wurden, einen wichtigen ersten Eindruck. Diese Ergebnisse können aber unter Umständen ein verzerrtes Bild der Realität vermitteln. Dies wird deutlich, wenn man die Aktivität des rekombinanten ABA3-NifS mit der des nativen Proteins vergleicht. Es konnte mit Hilfe dieses Assays gezeigt werden, dass die Aktivität des nativen Proteins um ein Vielfaches höher liegt. Obwohl in dieser Arbeit lediglich *Arabidopsis*-Rohextrakte mit Hilfe des Silbersulfid-Aktivitätsassays vermessen wurden, ist die Anwendung keinesfalls auf das pflanzliche System beschränkt. So kann z.B. auch in tierischen oder bakteriellen Extrakten die Aktivität von L-Cystein-Desulfurasen analysiert werden.

Zusätzlich zur Analyse der L-Cystein-Desulfurase-Aktivität ist der Assay ebenfalls geeignet, um die Aktivität von L-Selenocystein-Lyasen zu visualisieren, da der Färbemechanismus auch mit  $\text{H}_2\text{Se}$  funktioniert. Gerade für die NifS-Proteine des Typs II, welche sich durch eine deutlich höhere L-Selenocystein-Desulfurase-Aktivität auszeichnen als jene des Typs I, bringt diese Herangehensweise Vorteile. Die Sensitivität des Assays wird unter Verwendung von L-Selenocystein als Substrat deutlich gesteigert. Da zudem vieles über die

physiologische Bedeutung der L-Selenocystein-Lyase noch unbekannt ist, kann dieser Assay in der Zukunft wertvolle Erkenntnisse liefern.

### **3.4.3 Slot-Blot-Interaktionsassay**

Dieser Assay stellt zwar keine neue Methode im eigentlichen Sinne dar, er ermöglicht aber über die Kombination verschiedener bestehender Methoden den sensitiven und flexiblen Nachweis von Protein-Protein-Wechselwirkungen und erlaubt sogar vergleichende Aussagen über die Bindungsstärken.

Der Vorteil der hier entwickelten Herangehensweise ist, dass über die Verwendung der Miniblotter-Aparatur von Biometra mehrere Proben auf einer PVDF-Membran unter exakt den selben Bedingungen prozessiert und somit verglichen werden können. In der Regel verlangt die Variation von Parametern bei der Interaktion ein Zerschneiden der PVDF-Membran. Nur so können die einzelnen Membranteile in verschiedenen Lösungen inkubieren. Auch in nachfolgenden Waschschritten müssen diese Membranteile einzeln behandelt werden. Ab einem gewissen Punkt ist die Vergleichbarkeit solcher Proben nicht mehr gewährleistet. Zudem ist die generelle Handhabung kleiner Membranteile schwierig und umständlich. Die vergleichende Betrachtung vieler Proben wird dadurch deutlich erschwert. Mit dem Slot-Blot-Verfahren ergeben sich diese Probleme nicht.

Vor allem verschiedene Pufferbedingungen oder Proteinkonzentrationen können mit dieser Methode schnell getestet werden. Besonders geeignet ist dieser Assay daher für die Optimierung von Interaktionsbedingungen oder den Vergleich von Bindungsstärken zu verschiedenen potentiellen Bindungspartnern.

Ein weiterer Vorteil liegt in der Verwendung kleiner Volumina. Jede Spur des Miniblotters fasst ca. 170 µl. Dieses Probenvolumen ist ausreichend, um gleich mehrere Variationen der Interaktionsbedingungen zu testen. Um eine Membran in einer entsprechenden Lösung zu schwenken, ist ein deutlich größeres Volumen notwendig. Gerade bei wertvollen Proteinproben kann dieser Assay somit helfen, den Proteinverbrauch zu minimieren.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass das Slot-Blot-Verfahren eine neue Methode ist, um mit geringem Materialaufwand eine große Anzahl verschiedener Proben unter absoluter Vergleichbarkeit zu analysieren.

### 3.5 Rekombinante Überexpression von ABA3-NifS

Für das NH<sub>2</sub>-terminal mit einem His-Tag versehene ABA3-NifS wurden bei einer Expressionstemperatur von 37°C Ausbeuten von ca. 10 mg löslichen Proteins pro Liter Expressionskultur erzielt. Die Reinheit des 57 kDa großen Proteins wurde über SDS-PAGE mit anschließender Coomassie-Färbung ermittelt und lag direkt nach Affinitätsaufreinigung bei über 95 %. Diese Reinheit war für die meisten Experimente ausreichend. Im besonderen Fall wurde das Protein über Größenausschluß-Chromatographie zur Homogenität gereinigt. Dies erlaubte anhand eines Standards zudem die Größenbestimmung des nativen Proteins. Es wurde ermittelt, dass ABA3-NifS als Homodimer (ca. 110 kDa) vorliegt, während ABA3-CT ein Monomer ist. Daraus ergibt sich, dass die schon für das vollständige ABA3 beobachtete Dimerisierung (Bittner *et al.*, 2001) über die NH<sub>2</sub>-terminale Domäne vermittelt wird. Die Bildung von Homodimeren ist eine typische Eigenschaft der NifS-Proteine und stellt somit eine weitere Gemeinsamkeit zwischen dieser Enzymfamilie und ABA3-NifS dar. Für gereinigtes ABA3-NifS konnte eine gelbe Farbe beobachtet werden, was als ein erster Hinweis auf einen gebundenen PLP-Cofaktor gewertet wurde. Die gelbe Farbe ist ebenfalls typisch für NifS-Proteine.

Das rekombinant exprimierte ABA3-NifS zeichnete sich durch eine hohe Stabilität aus, was ohne weiteres die Lagerung bei 4°C über 2 Wochen erlaubte, ohne sichtbares Präzipitat oder den Verlust von Aktivität zu beobachten. Auch gegenüber wechselnden pH-Werten zeigte sich ABA3-NifS überaus unempfindlich, solange diese im basischen bis neutralen Bereich lagen. Im sauren Bereich dagegen wurde das Protein deutlich instabiler.

Das unter Standardbedingungen exprimierte Protein war lediglich zu ca. 60% mit PLP saturiert. Zwar konnte dieser Wert durch die Zugabe von 5 mM Pyridoxin zum Expressionsmedium auf über 90% erhöht werden, die Proteinausbeute reduzierte sich dabei aber dramatisch. Da die Erhöhung der Saturierung mit Cofaktor keine signifikante Beeinflussung der Enzym-Aktivität mit sich brachte, wurde im Rahmen dieser Arbeit auf die Behandlung mit Pyridoxin verzichtet und die relativ niedrige Saturierung in Kauf genommen.

### 3.6 Biochemische Charakterisierung von ABA3-NifS

#### 3.6.1 Die L-Cystein-Desulfurase-Aktivität

Nachdem für das vollständige ABA3 bereits eine L-Cystein-Desulfurase-Aktivität gezeigt werden konnte (Bittner *et al.*, 2001), wurde im Rahmen dieser Arbeit nun auch das separat

exprimierte ABA3-NifS auf diese Aktivität hin untersucht. Dabei zeigte sich, dass diese Domäne über alle notwendigen Bestandteile verfügt, um die Reaktion selbständig zu katalysieren. Zum einen bestätigte dieses Ergebnis die Annahme von zwei funktionell eigenständigen ABA3-Domänen, zum anderen wurde deutlich, dass der Umfang der NifS-ähnlichen Domäne über die Sequenz-Alignments korrekt bestimmt wurde.

Für ABA3-NifS konnte für das Substrat L-Cystein ein  $K_m$ -Wert von 35  $\mu\text{M}$  und eine spezifische Aktivität von  $3,7 \text{ mol Produkt} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1} \text{ Protein}$  ( $67 \text{ mU} \cdot \text{mg}^{-1}$ ) bestimmt werden. Dieser Wert bewegt sich in derselben Größenordnung wie zuvor für andere NifS-Proteine bestimmte Aktivitäten (AvNifS:  $90 \text{ mU} \cdot \text{mg}^{-1}$ , AvlscS  $67,6 \text{ mU} \cdot \text{mg}^{-1}$ , Zheng *et al.*, 1993/1998; EcCsdB(SufS):  $19 \text{ mU} \cdot \text{mg}^{-1}$ , EclscS:  $380 \text{ mU} \cdot \text{mg}^{-1}$ , Mihara *et al.*, 1999; AtCPNifS:  $14,2 \text{ mU} \cdot \text{mg}^{-1}$ , Pilon-Smits *et al.*, 2002).

Die Aktivitätsmessung bei steigenden Substratkonzentrationen zeigte, dass sich ABA3 nicht nach Michaelis-Menten verhält. Bereits ab Konzentrationen von 1 mM L-Cystein ist eine Inhibierung der Reaktion zu beobachten. Dieser Effekt der Substratinhibition ist bereits von NifS-Proteinen bekannt. Interessant ist in diesem Zusammenhang die Beobachtung von Tirupati *et al.* (2004) an einer L-Cystein-Desulfurase des Typs II aus *Synechocystis sp.* Hier wurde eine alternative Reaktion beschrieben, bei der ein freies Cystein als Akzeptor für das proteingebundenen Persulfid fungiert. Als Reaktionsprodukt entsteht hierbei ein freies L-Cystein-Persulfid. Dieser Reaktionsweg wird mit steigender Cystein-Konzentration wahrscheinlicher. Diese Beobachtung belegt somit, dass neben dem über PLP gebundenen Cystein zeitgleich ein zweites Cystein Zugang zum aktiven Zentrum haben kann. Dies könnte den inhibitorischen Effekt zu hoher Substratkonzentrationen bei der  $\text{H}_2\text{S}$ -Bestimmung erklären. Ein weiterer Effekt der Substratinhibition wurde ausführlicher von Behshad *et al.* im Jahr 2004 beschrieben. So wurde beobachtet, dass nicht nur die Aminogruppe des Substrates sondern auch dessen Thiolgruppe an das PLP angreifen kann. Da zusätzlich Thiole z.B. in Form von DTT in der Lösung vorhanden sind, wird dieser Effekt weiter verstärkt. Diese Thiole sind aber notwendig, um das aktive Zentrum über die reduktive Spaltung des Persulfids zu regenerieren. Die Situation *in vivo* gestaltet sich jedoch derart, dass diese Effekte der Inhibition unter physiologischen Bedingungen vermutlich keine Rolle spielen. Zunächst einmal ist freies L-Cystein in der Zelle toxisch, weshalb die Konzentrationen weit unterhalb der inhibitorisch wirksamen Konzentration liegen dürften. Zum anderen ist die reduktive Regenerierung des aktiven Zentrums *in vivo* nicht notwendig, da hier der Schwefel auf die jeweiligen Empfängerproteine übertragen wird. Es kann somit gesagt werden, dass ABA3-NifS eine selbständige L-Cystein-Desulfurase ist, welche typische Eigenschaften mit NifS-Proteinen teilt, was auf einen ähnlichen, wenn nicht gar gleichen Reaktionsmechanismus schließen lässt.

### 3.6.2 Die Selenocystein-Lyase-Aktivität

Wie schon erwähnt weisen alle NifS-Proteine neben der L-Cystein-Desulfurase-Aktivität auch eine L-Selenocystein-Lyase-Aktivität auf. Die von Mihara *et al.* 1997 vorgenommene Gruppierung der NifS-Proteine spiegelt sich prinzipiell auch in der Ausprägung dieser Aktivität wider. NifS-Proteine des Typs I weisen eine im Vergleich zur L-Cystein-Desulfurase-Aktivität nur unwesentlich höhere L-Selenocystein-Lyase-Aktivität auf. Sie liegt nur um Faktor 8-20 höher. Jene Enzyme des Typs II haben in der Regel eine um Faktor 200-290 höhere L-Selenocystein-Lyase-Aktivität.

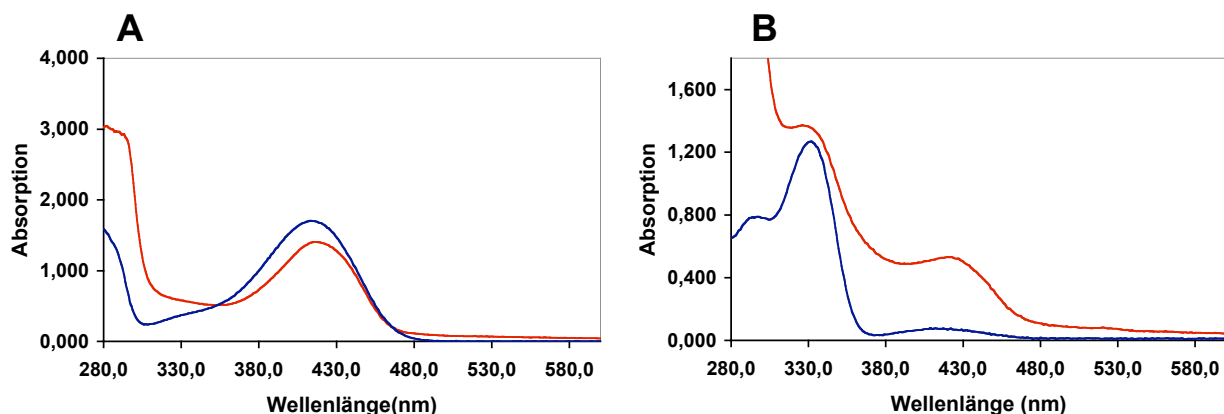
Auch für ABA3-NifS konnte diese Aktivität gemessen werden. Obwohl ABA3-NifS zu den Enzymen des Typs II gehört, liegt die Aktivität mit  $21,4 \text{ mol Produkt} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1} \text{ Protein}$  ( $390 \text{ mU} \cdot \text{mg}^{-1}$ ) nur um Faktor 6 höher als die entsprechende L-Cystein-Desulfurase-Aktivität. Da bei Verwendung von L-Selenocystein als Substrat unter den gewählten Versuchsbedingungen der pH-Wert des Reaktionsansatzes in den stark sauren Bereich abfiel, kann dieser Wert allerdings nur als vorläufiger Wert angesehen werden. Die Beobachtung, dass ABA3-NifS im sauren pH-Bereich deutlich destabilisiert wird, gibt Anlaß zu der Vermutung, dass die tatsächliche Aktivität deutlich höher ist. Nachdem zweifelsfrei beide NifS-typischen Aktivitäten auch für ABA3-NifS gezeigt werden konnten, wurden im Folgenden die beteiligten Cofaktoren und Aminosäurereste identifiziert, um die Reaktionsmechanismen im Detail verstehen zu können.

### 3.6.3 Der PLP-Cofaktor

Da sich ABA3-NifS durch eine deutliche Gelbfärbung auszeichnet, wurde ein UV/Vis-Spektrum aufgenommen, um ein detailliertes Bild von den Absorptionseigenschaften zu bekommen. Neben dem Maximum bei 280 nm, welches alle Proteine aufweisen, bildete sich ein charakteristischer Absorptionspeak bei 420 nm. Dieser Peak ist typisch für proteingebundenes PLP, wie es auch NifS-Proteine besitzen (Zheng *et al.*, 1993). Um zweifelsfrei die Natur des chromophoren Cofaktors belegen zu können, wurde ein chemischer Nachweis durchgeführt, bei dem das Reaktionsprodukt aus PLP und Cyanid anhand seiner sehr spezifischen Absorptions- und Emissionseigenschaften identifiziert werden kann (Adams, 1969). Als Referenz wurden dafür die Absorptions- sowie Emissionsspektren eines Kontrollansatzes mit freiem PLP nach entsprechender Aufarbeitung gemessen und mit analog aufbereiteten Proteinproben verglichen. Die Spektren stimmten exakt überein, womit die Natur des Cofaktors zweifelsfrei als PLP bestätigt werden konnte.



Das unter NifS-Proteinen und Moco-Sulfurasen konservierte PLP-Bindemotiv galt als wahrscheinlichster Ort der PLP-Bindung in ABA3. Um dies endgültig zu bestätigen, wurde der konservierte Lysin-Rest in ABA3-NifS gegen ein Serin ausgetauscht. Diese K271S-Variante belegte über den dramatisch reduzierten PLP-Gehalt, dass ABA3 den Cofaktor nach den konservierten Mechanismen der NifS-Proteine bindet. Da zudem die L-Cystein-Desulfurase-Aktivität der Protein-Variante erheblich beeinträchtigt ist, war auch die Beteiligung des PLP am Reaktionsmechanismus bewiesen. Unterstrichen wird die direkte Beteiligung des PLP an der Schwefelmobilisierung durch die Beobachtung, dass sich ABA3-NifS nach Zugabe von L-Cystein entfärbt, was mit einer charakteristischen Veränderung des UV/Vis-Spektrums einhergeht. Der Peak bei 420 nm flacht deutlich ab und bei 320 nm entsteht ein neues Maximum. Referenzversuche mit freiem PLP und L-Cystein zeigten exakt denselben Effekt (Abb. 3.3). Wie schon früher für *A.vinelandii*-NifS gezeigt (Zheng *et al.*, 1993), ist das PLP also auch bei ABA3 an der Substratbindung beteiligt. Nach diesen Erkenntnissen konnte somit der über ein konserviertes Motiv gebundene PLP-Cofaktor und dessen Beteiligung am Reaktionsmechanismus als weitere biochemische Gemeinsamkeit von ABA3-NifS mit den NifS-Proteinen gesehen werden.



**Abb. 3.3:** **Spektrale Charakteristika von PLP und ABA3-NifS.** ABA3-NifS und freies PLP verhalten sich in Bezug auf die Absorptionsänderungen bei Zugabe von L-Cystein identisch. (A) ABA3-NifS (rot) und PLP (blau) in Abwesenheit von L-Cystein. (B) ABA3-NifS (rot) und PLP (blau) nach Zugabe von L-Cystein.

#### 3.6.4 Das Persulfid

Es war bereits bekannt, dass L-Cystein durch ABA3 zu L-Alanin und einem Schwefel-Intermediat umgewandelt wird (Bittner *et al.*, 2001). Über die Natur dieses Schwefels konnte zu diesem Zeitpunkt allerdings noch nichts gesagt werden. Da NifS-Proteine den Schwefel in Form eines Persulfids binden, sollte auch bei ABA3-NifS nach dieser Form des aktivierten

Schwefels gesucht werden. Dazu wurde eine auf 1,5-I-AEDANS basierende Nachweismethode gewählt, mit der Zheng *et al.* 1994 den Persulfid-Schwefel für *A. vinelandii* NifS nachweisen konnten. Die Substanz 1,5-I-AEDANS bindet spezifisch an Thiol-Gruppen und kann über ihre Fluoreszenz sensitiv nachgewiesen werden.

Zunächst konnte gezeigt werden, dass ABA3-NifS nach Inkubation mit 1,5-I-AEDANS eine Fluoreszenz aufweist, welche nicht durch reduzierende Agenzien wie z. B. DTT abspaltbar ist. Dies lässt den Schluss zu, dass das Protein eine Thiol-Gruppe in Form eines Cystein-Rests für das 1,5-I-AEDANS zugänglich exponiert. In einem weiteren Schritt wurde das Protein zunächst mit L-Cystein vorinkubiert, bevor es mit 1,5-I-AEDANS reagierte. Auch hier bindet das 1,5-I-AEDANS zunächst fest an das Protein. Unter Zugabe von DTT löst sich die Fluoreszenz aber vom Protein ab und ist dann in der niedermolekularen Fraktion detektierbar und quantifizierbar. Mit zunehmender Inkubationszeit von ABA3 mit L-Cystein verbleibt dabei immer weniger Fluoreszenz am Protein. Dies lässt den Schluss zu, dass der zunächst frei zugängliche proteineigene Cystein-Rest durch die gebildete Schwefelspezies maskiert wird und somit nicht mehr direkt zugänglich für das 1,5-I-AEDANS ist. Auch wird so gezeigt, dass der gebildete Schwefel seinerseits das 1,5-I-AEDANS binden kann und zudem durch DTT abspaltbar ist. Diese Beobachtungen belegen, dass der mobilisierte Schwefel in Form eines Persulfids gebunden wird. Die zweifelsfreie Identifizierung eines Persulfid-Intermediates stellt eine weitere Gemeinsamkeit im Reaktionsmechanismus von NifS-Proteinen und ABA3 dar. Bis zu diesem Punkt sind die Reaktionsabläufe identisch.

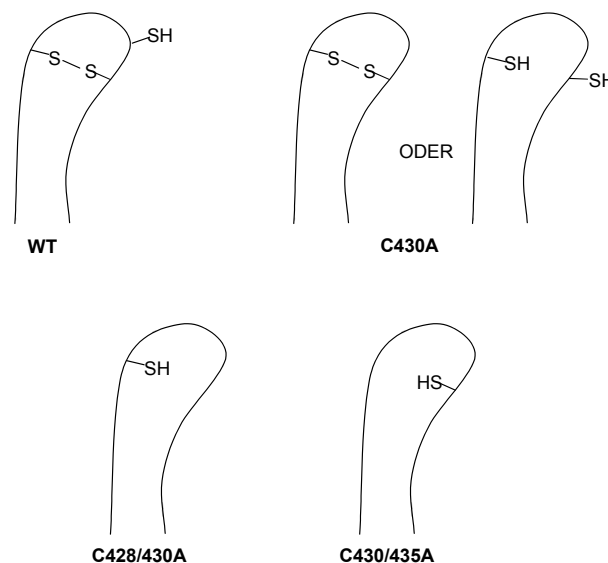
### 3.6.5 Die beteiligten Cystein-Reste

Welcher Cystein-Rest in ABA3 an der Bindung des Persulfids beteiligt ist, sollte durch die Analyse von Proteinvarianten geklärt werden. Ein besonderes Augenmerk lag dabei auf dem unter Moco-Sulfurasen und NifS-Proteinen strikt konservierten Cystein-Rest, für den zuerst im Fall von *A. vinelandii*-NifS (Zheng *et al.*, 1994), später aber auch für immer mehr NifS-ähnliche Proteine eine Funktion bei der Persulfid-Bindung gezeigt werden konnte (zusammengefasst durch Mihara & Esaki, 2002).

Der Versuch zur Persulfid-Markierung mit 1,5-I-AEDANS wurde daher mit der ABA3-NifS C430A Variante wiederholt. Die Messung der niedermolekularen Fraktion ergab hierbei lediglich ca. 18% der Fluoreszenz verglichen mit dem Wildtyp-Protein. Dieses Ergebnis lässt zwei Schlussfolgerungen zu. Zum einen ist der konservierte Cystein-Rest auch bei ABA3 an der Persulfid-Bindung beteiligt. Zum anderen ist ABA3-NifS aber auch nach Austausch dieses Cysteins prinzipiell noch in der Lage, ein Persulfid zu mobilisieren und zu binden.

Dies konnte für die entsprechende Variante des *A. vinelandii* NifS oder CSD und CsdB aus *E.coli* nicht beobachtet werden. Mit dem Austausch des Cysteins verlieren diese Proteine diese Fähigkeit gänzlich (Zheng *et al.*, 1994; Mihara *et al.*, 2000). Da mit diesem Versuchsaufbau ein Persulfid nachgewiesen wird, welches direkt über einen proteineigenen Cystein-Rest gebunden vorliegt, kann der durch Tirupati *et al.* beschriebene alternative Reaktionsweg (siehe 3.5.2) nicht als Erklärung für die Restaktivität von ABA3-NifS C430A dienen. Es muss somit strukturelle Unterschiede zwischen ABA3-NifS und NifS-Proteinen geben, auf die sich diese Eigenschaft zurückführen lässt. Bei genauerer Betrachtung der Region um das konservierte Cystein430 in ABA3-NifS treten zwei weitere Cystein-Reste hervor, welche zwar in allen Moco-Sulfurasen strikt konserviert sind, nicht aber in den NifS-Proteinen vorkommen. Sie befinden sich an Position 428 und 435 und somit in direkter Nähe zum konservierten Cystein430. Vermutlich ist eines oder sogar beide dieser Cysteine in der Lage, die Funktion des Cystein430 mit geringerer Effizienz zu übernehmen. Eine Voraussetzung für diese Theorie wäre eine gewisse Flexibilität der Region um den aktiven Cystein-Rest. Interessanterweise konnte für viele NifS-Proteine eine Loop-Struktur gezeigt werden, an deren Spitze der konservierte Cystein-Rest des aktiven Zentrums liegt (Mihara & Esaki, 2002; Kaiser *et al.*, 2000; Cupp-Vickery *et al.*, 2003). Eine solcher Loop stellt in der Tat eine flexible Struktur dar und ist oft in der Lage, größere Konformationsänderungen zu vollziehen. Zwar konnte gezeigt werden, dass im Fall von L-Cystein-Desulfurasen des Typs II diese Struktur kürzer ist als bei Enzymen des Typs I, eine gewisse Flexibilität muss aber auch in diesem Fall gewährleistet sein. Es ist somit durchaus möglich, dass das Cystein428 und/oder Cystein435 die Funktion des Cystein430 teilweise übernehmen können. Um diesen Punkt zu klären, wurden Proteinvarianten mit einer Doppelmutation erstellt, in denen jeweils zwei der Cysteine gegen Alanin ausgetauscht wurden (C428/430 und C430/435). Alle Cystein-Varianten wurden im Vergleich zum Wildtyp-Protein auf ihre L-Cystein-Desulfurase-Aktivität hin untersucht. Dabei wurde die Menge des insgesamt gebildeten Persulfids gemessen. Es zeigte sich, dass im Vergleich zum Wildtyp-Protein die Varianten C428/430 mit 30% und C430/435 mit 32% Restaktivität die Variante C430 mit 18% Restaktivität überraschenderweise übertrafen. Eine mögliche Erklärung für diesen unerwarteten Effekt könnte in der Ausbildung einer Disulfidbrücke zwischen C428 und C435 zu finden sein (Abb. 3.4). In ABA3-NifS stehen drei Cystein-Reste zur Verfügung, von denen zwei die Disulfidbrücke ausbilden und der Dritte Cystein-Rest (C430) somit frei als Akzeptor für das Persulfid zur Verfügung steht (Abb. 3.4, WT). Wird dieses Cystein nun gegen Alanin ausgetauscht, verbleiben nur die beiden an der Disulfidbrücke beteiligten Cysteine. Damit einer der Beiden das Persulfid binden kann, muss zeitgleich die Disulfidbrücke gespalten werden (Abb. 3.4, C430A). Beide Bindungen stehen also in Konkurrenz zueinander. Mit dem Austausch von zwei Cystein-Resten verbleibt lediglich ein weiteres Cystein, dessen Thiol-

Gruppe stets frei vorliegt und so das Persulfid binden kann (Abb. 3.4, C428/430A, C430/435A).



**Abb. 3.4:** Modell des putativen Loops der verschiedenen ABA3-Proteinvarianten. (WT) Der Cystein-Rest C430 liegt frei vor, um den Persulfid-Schwefel zu binden. (C430A) Das Cystein 430 ist mutiert. Die verbleibenden Thiolgruppen wechseln zwischen Disulfidbindung und freien Gruppen zur Persulfidbindung. (C428/430A) Es liegt nur ein ungepaarter Cystein-Rest vor. Er kann das Persulfid binden. (C430/435A) Auch hier verbleibt nur ein Cystein-Rest. Er kann ebenfalls das Persulfid binden.

Ein Grund, weshalb die Bildung eines Persulfids in eine enzymatische Umgebung eingebettet wird, ist die Eigenschaft der Proteinkomponente, das reaktionsfreudige und zudem für die Zelle toxische Persulfid zu schützen und dessen spezifische Übertragen zu gewährleisten. Der Austausch der Cystein-Reste stellt einen Eingriff in die Struktur des aktiven Zentrums dar und geht unter Umständen mit einer Beeinträchtigung des stabilisierenden Effekts einher. Das Persulfid, welches an den alternativen Cystein-Resten gebunden wird, ist eventuell leichter zugänglich für die im Reaktionsansatz vorhandenen, reduzierenden Substanzen wie z.B. DTT, wodurch der Substratumsatz beschleunigt wird.

Es steht jedoch außer Frage, dass in ABA3-NifS im Unterschied zu *A.vinelandii* NifS der konservierte Cystein-Rest durch benachbarte Cystein-Reste teilweise ersetzt werden kann. Im nativen Protein haben das C428 und C435 aber mit aller Wahrscheinlichkeit keinen Anteil an der Persulfid-Bindung. Da sie aber unter allen Moco-Sulfurasen konserviert sind, erfüllen sie vermutlich eine wichtige Funktion bei der Interaktion mit der C-terminalen Domäne oder der Schwefelübertragung. So könnten z.B. Protein-Protein-Interaktionen über Disulfidbrücken initiiert und stabilisiert werden.

Auch in Bezug auf die L-Selenocystein-Lyase-Aktivität lassen sich Unterschiede zwischen ABA3-NifS und den NifS-Proteinen feststellen. Für letztere konnte gezeigt werden, dass der Mechanismus unabhängig von dem konservierten Cystein-Rest abläuft (Mihara *et al.*, 2000; Loiseau *et al.*, 2003). Im Fall von ABA3 ist die C430A-Variante aber in der L-Selenocystein-Lyase-Aktivität eingeschränkt. Sie erreicht nur 19,6% der Wildtyp-Aktivität. Eventuell findet sich in dieser Abweichung auch eine Erklärung für die relativ niedrige L-Selenocystein-Lyase-Aktivität von ABA3-NifS, indem sie auf einen von den übrigen NifS-Proteinen abweichenden Reaktionsmechanismus schließen lässt. Aber auch hier muss erneut erwähnt werden, dass der niedrigen pH-Wert in der Reaktionslösung bei der Bestimmung der L-Selenocystein-Lyase-Aktivität einen hemmenden Einfluss auf ABA3-NifS haben kann. Da die Variante ABA3-NifS C430A bereits gewissen strukturellen Veränderungen im aktiven Zentrum ausgesetzt ist, hat der niedrige pH-Wert auf dieses Protein vielleicht einen stärkeren Effekt.

### 3.6.6 Fe/S-Cluster Assemblierung

Den Beweis, dass ABA3-NifS zumindest *in vitro* funktionell ein NifS-Protein ersetzen kann, erbrachte ein Assay zur Fe/S-Cluster-Assemblierung basierend auf der Nif-Maschinerie (nach Dos Santos *et al.*, 2004). Unter Verwendung verschiedener Nif-Genprodukte können in diesem Assay Fe/S-Cluster generiert und auf eine inaktive, Fe/S-Cluster-freie Apo-Form der Nitrogenase übertragen werden. Diese erhält dadurch ihre Aktivität, welche in einem Aktivitätsassay über die Bildung von H<sub>2</sub> quantifiziert werden kann. So können Rückschlüsse über die Effizienz der vorangegangenen Fe/S-Cluster-Assemblierung gezogen werden.

Die Aufgabe der L-Cystein-Desulfurase und somit die Bereitstellung des Schwefels übernimmt *in vivo* dabei das Protein NifS (Av-NifS). Das Plattform-Protein NifU ist der Empfänger des Schwefels und assembliert die transienten Fe/S-Cluster, bevor sie auf die Apo-Nitrogenase übertragen werden. In dieser Arbeit wurde nun das Av-NifS Protein gegen ABA3-NifS ausgetauscht. Die Aktivität der Nitrogenase sollte später Aufschluss darüber bringen, wie effektiv NifU den Schwefel von ABA3-NifS übernehmen und zur Fe/S-Cluster-Assemblierung einsetzen kann. Im Vergleich zu einem Kontroll-Ansatz mit Av-NifS erreichte die Nitrogenase dabei im Fall von ABA3-NifS 74% der Aktivität. Dieser vergleichsweise hohe Wert lässt zwei Schlussfolgerungen zu. So kann entweder der Mechanismus der Schwefelübertragung von Av-NifS bzw. ABA3-NifS auf NifU in dem *in vitro*-Assay unspezifisch sein. In diesem Fall könnten viele Proteine, welche auf ihrer Oberfläche ein Persulfid präsentieren oder den Schwefel während der Probenaufarbeitung in den Ansatz

entlassen, ähnlich hohe Ergebnisse erzielen. Andererseits könnte das Ergebnis dafür sprechen, dass es sich bei dem Mechanismus zur Schwefelmobilisierung bei ABA3-NifS und den anderen NifS-Proteinen um einen nicht nur funktionell sondern auch strukturell stark konservierten Prozess handelt. In diesem Fall könnte der Transfer des Schwefels von ABA3-NifS auf NifU spezifisch sein und spräche einmal mehr für eine enge Verwandtschaft von ABA3 mit den NifS-Proteinen. NifU und seine Homologen verfügen über drei konservierte Cystein-Reste, welchen eine Beteiligung an der Fe/S-Cluster-Assemblierung zugeschrieben wird. Im Jahr 2004 konnten Dos Santos *et al.* anhand des Schwefeltransfers von Av-NifS auf NifU zeigen, dass Austausche einzelner dieser Cysteine in NifU gegen Alanin zwar dessen Fähigkeit, Fe/S-Cluster zu bilden, beeinträchtigen, keiner der Aminosäureaustausche diese Fähigkeit aber vollkommen zerstörte. Zusätzlich dazu wurden 2005 an dem zu NifU homologen IscU in *A.vinelandii* dieselben konservierten Cysteine einzeln mutiert (Smith *et al.*, 2005). Die Ergebnisse belegen, dass die Übertragung des Persulfids von IscS auf IscU nicht von einem bestimmten Cystein-Rest in IscU abhängig ist. Die Interaktion beider Proteine sowie der Schwefeltransfer waren weitestgehend unbeeinflusst. Dies erleichtert den Schwefeltransfer zwischen beiden Proteinen und könnte eine Erklärung für die relativ hohe Effizienz von ABA3-NifS in dem Assay sein. Letztendlich beweist dieser Assay aber, dass ABA3-NifS in der Lage ist, das Persulfid-Intermediat auf einen anderen Cystein-Rest zu transferieren. Dies ist ein Aspekt, welcher bei der Übertragung des Persulfid-Schwefels auf den Moco der Zielproteine ebenfalls von Bedeutung sein kann.

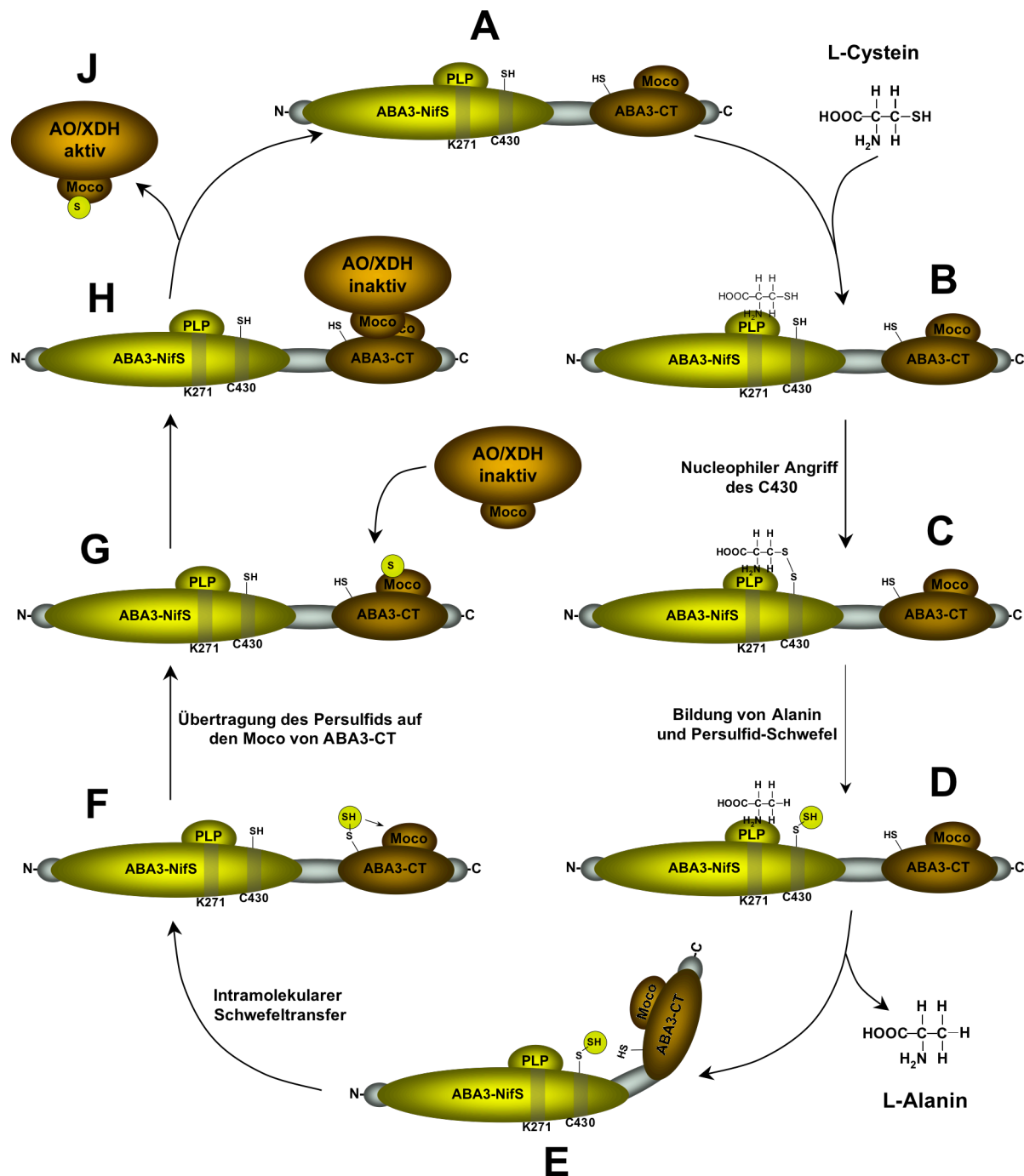
### 3.7 Die Interaktion der beiden ABA3-Domänen

Obwohl die funktionelle Abhängigkeit der beiden Moco-Sulfurase-Domänen *in vivo* schon früh gezeigt werden konnte (Sagi *et al.*, 2002), gestaltete sich der Nachweis einer Interaktion für die einzeln rekombinant exprimierten Proteine als überaus schwierig. In Gelfiltrations-Experimenten, welche in der Regel gut geeignet sind, um auch schwache Protein-Protein-Wechselwirkungen nachzuweisen, konnte keinerlei Interaktion nachgewiesen werden. Auch die Verwendung von Crosslinkern erbrachte keine positiven Resultate (S.Wollers, pers. Mitteilung). Auf der anderen Seite konnte ein stabilisierender Effekt von ABA3-NifS auf ABA3-CT festgestellt werden. Eine Lösung von ABA3-CT, welche sich nach einem Pufferwechsel stark trübt, wird nach der Zugabe von ABA3-NifS innerhalb weniger Sekunden wieder klar. Lightscatter-Experimente belegten zudem, dass eine Mischung beider Proteine über mehrere Minuten stabil ist, während ABA3-CT unter denselben Versuchsbedingungen sehr schnell präzipitiert.

Erst die Anwendung des in dieser Arbeit entwickelten Slot-Blot-Verfahrens ermöglichte schließlich erstmals den Nachweis einer Wechselwirkung zwischen beiden Domänen. Da nur unter relativ schonenden Bedingungen diese Interaktion zu erkennen war, scheint es sich um sehr schwache Wechselwirkungen zu handeln. Für eine sehr schwache Interaktion von zwei funktionell stark voneinander abhängigen Proteinen kann es verschiedene Erklärungen geben. Unter Umständen werden beide ABA3-Domänen gerade deshalb als ein fusioniertes Protein exprimiert, weil ihre funktionelle Abhängigkeit für den Mechanismus der Moco-Sulfurierung sehr hoch ist und die spezifische Verwendung des reaktionsfreudigen Persulfid-Schwefels für die Moco-Sulfurierung gesichert sein muss. Gerade die verbindende Linker-Region zwischen beiden Domänen wird bei der separaten Expression beider Domänen aber zerstört.

Genauso kann aber auch das Expressionssystem einen Einfluss auf die Interaktionsfähigkeit haben. Es darf nicht vergessen werden, dass beide Proteine mit einem His-Tag fusioniert sind, welcher potentielle Bindemotive verdecken oder sogar strukturelle Veränderungen des Proteins mit sich bringen kann. Auch kann nicht ausgeschlossen werden, dass *in vivo* ein dritter Interaktionspartner in den Reaktionsmechanismus involviert ist. Wie das Beispiel von SufS zeigt, kann die Zugabe eines Interaktionspartners (SufE) die Aktivität deutlich steigern (Ollagnier-de-Choudens *et al.*, 2003; Outten *et al.*, 2003; Ye *et al.*, 2006).

Im Rahmen dieser Arbeit konnte für die separat exprimierten ABA3-Domänen erstmals der Transfer eines Persulfid-Schwefels gezeigt werden. Der durch ABA3-NifS mobilisierte Schwefel wurde in *in vitro*-Experimenten auf einen bislang unbekannten Cystein-Rest des ABA3-CT übertragen. Dieser Schwefeltransfer findet vermutlich auch *in vivo* in Form einer intramolekularen Schwefelübertragung statt. Für fast alle Mechanismen, welche von der Bildung eines Persulfid-Schwefels abhängig sind, konnte gezeigt werden, dass das Persulfid nach seiner Synthese in einem ersten Schritt auf einen Cystein-Rest des Empfänger-Proteins übertragen wird (Kessler, 2006). Es ist daher anzunehmen, dass auch im Mechanismus der Moco-Sulfurierung der Schwefel nicht direkt von ABA3-NifS auf den Moco, sondern zunächst auf einen ABA3-CT-eigenen Cystein-Rest übertragen wird. ABA3-CT verfügt über drei unter allen Moco-Sulfurasen konservierte Cystein-Reste. Diese können ihre Funktion bei der Interaktion mit ABA3-NifS, bei der Persulfid-Bindung, bei der Koordinierung des Moco oder der Erkennung von AO und XDH erfüllen. Welches der Cysteine als Empfänger des Persulfids fungiert, konnte bislang nicht geklärt werden. Es steht aber fest, dass der Transfer eines Persulfid-Schwefels von ABA3-NifS als Ort der Synthese auf ABA3-CT möglich ist. Diese Erkenntnisse erlauben die Erstellung eines ersten Modells für den Mechanismus der Moco-Sulfurierung durch ABA3 in *A. thaliana* (Abb. 3.6):



**Abb. 3.5: Modell zum Mechanismus der Moco-Sulfurierung.** Der Zyklus beginnt mit einem Persulfid-freien und Substrat-freien ABA3-Protein (A). An den PLP-Cofaktor wird das Substrat L-Cystein über dessen Aminogruppe gebunden (B). Es kommt zu einem nucleophilen Angriff des C430 an die Thio-Gruppe des L-Cysteins (C). Der Schwefel wird unter Bildung von L-Alanin und Persulfid auf das C430 übertragen (D). L-Alanin verlässt als Produkt das Enzym und ABA3-CT koordiniert einen seiner Cystein-Reste zum aktiven Zentrum (E). Das Persulfid wird auf den Cystein-Rest des ABA3-CT übertragen (F). Innerhalb des ABA3-CT wird das Persulfid an das Mo-Atom des Moco weitergegeben. Inaktive AO/XDH bindet an ABA3-CT (G). Es kommt zum Transfer des Schwefels auf den Moco der Zielproteine. Dabei wird entweder nur der Schwefel oder aber der gesamte Moco ausgetauscht (H). Das aktive Zielprotein AO/XDH verlässt ABA3 (J). ABA3 liegt nun wieder in seiner ursprünglichen Form vor (A).



Ein über das konservierte Lysin 271 gebundener PLP-Kofaktor ist essentiell für die Bindung des Substrates L-Cystein über dessen Aminogruppe. Die Thiol-Gruppe des Cysteins kommt dabei in räumliche Nähe zu dem konservierten Cystein430. Der Schwefel wird in Form eines Persulfids auf diesen Cystein-Rest übertragen und das gebildete Alanin verlässt das Protein. Das Persulfid wird nun auf einen bislang unbekannten Cystein-Rest von ABA3-CT übertragen. Da ABA3-CT selber Moco gebunden hat, ist es relativ wahrscheinlich, dass der Schwefel nun zunächst auf das Mo-Atom des ABA3-eigenen Moco übertragen wird. Dies wird durch die Beobachtung untermauert, dass ABA3-CT nach Aufreinigung aus *E.coli* einen sulfurierten Moco gebunden hat (Wollers *et al.*, eingereicht). Ob schließlich der komplette Moco ausgetauscht wird, oder lediglich der Schwefel übertragen wird, ist bislang unklar.

### 3.8 Der Nachweis des nativen ABA3 in Pflanzenmaterial

Die Arbeit an rekombinant exprimierten Proteinen ist ein wesentlicher Schritt, um biochemische Charakteristika herausarbeiten zu können. Früher oder später ist es aber umso wichtiger, das Protein in seiner physiologischen Umgebung und in Anwesenheit aller möglichen Interaktionspartner und relevanten Substanzen zu untersuchen. Nur so kann ein umfassendes Bild über die tatsächliche biologische Wirkungsweise des Enzyms gewonnen werden. Ein weiterer Teil der Arbeit beschäftigte sich daher mit der Analyse von nativem ABA3.

Versuche, ABA3 mittels Antikörpern in Pflanzenrohextrakten nachzuweisen, schlugen fehl. Dabei wurden auch gestresste Materialien getestet, von denen bekannt war, dass unter den jeweiligen Bedingungen zumindest die Transkription von *aba3* induziert wird. Da die Qualität der verwendeten Antikörper über Kontrollen sichergestellt wurde, ist vermutlich der Expressionslevel von ABA3 zu gering, um detektierbar zu sein. Es musste also ein anderer Weg gefunden werden, um ABA3 nachzuweisen. Ein möglicher Ansatz dabei war die Identifizierung von ABA3 aufgrund seiner L-Cystein-Desulfurase-Aktivität. Erschwerend kam hierbei aber hinzu, dass *A.thaliana* mit dem mitochondrialen AtNfs1/MtNifS und dem plastidären AtNfs2/CpNifS neben ABA3 noch zwei weitere L-Cystein-Desulfurasen enthält. Dies machte die Trennung dieser Enzyme nötig, bevor sie einzeln analysiert werden konnten.

Ein unverzichtbares Werkzeug, um ABA3 auf diese Weise in pflanzlichen Extrakten verfolgen zu können, war der im Rahmen dieser Arbeit entwickelte Silbersulfid-Aktivitätsassay. Mit ihm gelang es erstmals, ABA3 in frischen Rohextrakten aus *A. thaliana*

anhand der L-Cystein-Desulfurase-Aktivität bzw. der L-Selenocysteine-Lyase-Aktivität spezifisch nachzuweisen.

Eine typische Aktivitätsfärbung von *A. thaliana* Rohextrakten ergibt mit L-Cystein als Substrat im Gel drei Banden. Die Analyse ABA3-defizienter *A. thaliana*-Mutanten erlaubte im direkten Vergleich mit Wildtyp-Pflanzen die eindeutige Identifizierung von ABA3 als die oberste dieser drei Banden. Sie ist in den Mutanten-Extrakten nicht vorhanden, während die beiden anderen Banden mit ähnlicher Intensität hervortreten. Da neben ABA3 noch zwei weitere Enzyme für die Aktivitätsfärbung im Gel in Frage kamen, schien die Zuordnung zunächst einfach. Je eine der Banden repräsentiert die Aktivität von AtNfs1/*Mt*NifS bzw. AtNfs2/*Cp*NifS. Versuche mit gereinigten Mitochondrien bzw. Plastiden ergaben aber ein anderes Bild. Die mittlere der drei Banden fand sich in beiden Proben, während die untere Bande nur in isolierten Plastiden auftrat. Die Identifizierung der anderen beiden L-Cystein-Desulfurasen gestaltet sich somit relativ schwierig. ABA3 hingegen konnte eindeutig mit der obersten Bande in Verbindung gebracht und somit weiter analysiert werden.

Bemerkenswert ist, dass sich in einer Rohextrakt-Probe, welche 100 µg Gesamtprotein enthält, eine ABA3-Aktivitäts-Bande entwickelt, die das Signal von 100 µg reinem, rekombinant exprimierten ABA3-NifS ca. um Faktor 10 übersteigt. Es besteht also eine enorme Diskrepanz zwischen der Aktivität des rekombinant exprimierten und des nativen Proteins. Dies kann verschiedene Ursachen haben. Zum einen wird ABA3-NifS mit einem NH<sub>2</sub>-terminal fusionierten His-Tag exprimiert. Dieser kann die Faltung des Proteins beeinträchtigen. Die Kristallstruktur von *E. coli*-IscS zeigte zudem, dass das PLP auch über den Rest eines Histidins koordiniert wird (Cupp-Vickery *et al.*, 2003). Hier könnte der His-Tag störend wirken, und somit die Aktivität beeinflussen. Zum anderen ist es möglich, dass das Bakterium *E. coli* nicht alle post-translationalen Modifikationen an eukaryontischem ABA3-NifS vornehmen kann. Genauso steht aber auch die Bildung von Protein-Komplexen zur Debatte. So konnte für die L-Cystein-Desulfurase SufS aus *E. coli* gezeigt werden, dass sie einen engen Komplex mit SufE eingeht, was einen stimulierenden Effekt auf seine Aktivität hat (Ollagnier-de-Choudens *et al.*, 2003; Outten *et al.*, 2003; Ye *et al.*, 2006). In jüngster Zeit konnten immer mehr solcher Interaktionspartner und Multi-Enzym-Komplexe für NifS-Proteine gezeigt werden. Es ist daher überaus wahrscheinlich, dass auch ABA3 in der Pflanze mit verschiedenen stimulierenden Interaktionspartnern Komplexe eingeht.

Bei NifS-Proteinen des Typs II ist die L-Selenocystein-Lyase-Aktivität in der Regel mehr als 200 mal höher als die entsprechende L-Cystein-Desulfurase-Aktivität. Die für rekombinantes ABA3-NifS im L-Alanin-Assay gemessene L-Selenocystein-Lyase-Aktivität war nur um ca. Faktor 6 höher und somit überraschend gering. Aber wie bereits für die L-Cystein-Desulfurase-Aktivität gezeigt, scheint es große Unterschiede zwischen dem rekombinant exprimierten Protein und dem nativen ABA3 aus Pflanzenrohextrakten zu geben. So zeigte

der Aktivitätsassay im nativen Gel unter Verwendung von L-Selenocystein als Substrat bereits nach wenigen Minuten ein Signal. Eine entsprechende Färbung mit L-Cystein benötigt wenigstens 6 Stunden. Die Aktivität scheint also *in vivo* um ein Vielfaches höher zu sein, als das rekombinante Protein erwarten lässt. Auch hier können Interaktionspartner *in vivo* oder strukturelle Abweichungen des rekombinanten Proteins der Grund sein.

### 3.9 Die Analyse natürlicher ABA3-Mutationen

Alle bislang beschriebenen Protein-Varianten enthielten Mutationen, welche gezielt eingebaut wurden, um an definierter Stelle in den Reaktionsmechanismus einzugreifen. Neben diesen artifiziellen Varianten gibt es aber auch natürlich entstandene Mutationen, welche wegen ihres Effektes auf die Enzymfunktion identifiziert werden konnten. In dieser Arbeit wurden die ABA3-NifS G469E-Variante und die ABA3-NifS T301I-Variante untersucht. Die erstgenannte entspricht der *aba3-1*-Mutante aus *A. thaliana*, welche durch Leon-Kloosterziel *et al.* (1996) erstmals beschrieben wurde. Die erste genetische Charakterisierung der *aba3-1*-Mutation erfolgte durch Bittner *et al.* im Jahr 2001. Bei der zweiten Variante handelt es sich ursprünglich um eine Mutation der humanen Moco-Sulfurase HMCS (U. Finckh, pers. Mitteilung), welche auf ABA3-NifS übertragen wurde.

Für die Protein-Variante G469E konnte eine deutlich reduzierte L-Cystein-Desulfurase-Aktivität gezeigt werden. Da hier keine der unter NifS-Proteinen konservierten Aminosäuren betroffen ist, hat dieser Austausch wegen seiner Nähe zum aktiven Zentrum vermutlich einen generellen strukturellen Effekt, der die Bindung bzw. Umsetzung des Substrates L-Cystein beeinträchtigt. Glycin ist eine evolutionär sehr stabile Aminosäure. Als kleinste und im Aufbau einfachste Aminosäure kann ihr Austausch gegen eine andere Aminosäure mit größerer Seitenkette schnell den strukturellen Aufbau des gesamten Proteins stören. Ein solcher Effekt ist Vermutlich die Ursache für die starke Reduktion der Aktivität der G469E Proteinvariante.

Die T301I-Protein-Variante zeigt ebenfalls lediglich eine minimale Restaktivität. Da hier spektrale Abweichungen im Bereich des PLP-Absorptions-Peaks beobachtet wurden, kann auf eine Beeinträchtigung der PLP-Bindung geschlossen werden. Da die korrekte Koordinierung des PLP-Cofaktors durch das Zusammenspiel mehrerer Aminosäure-Reste zustande kommt, ist ein indirekter Einfluss auf die PLP-Koordinierung wahrscheinlich, auch wenn der mutierte Aminosäurerest selbst nicht an der Bindung des PLP beteiligt ist.

### 3.10 Die Funktion von ABA3 *in vivo*

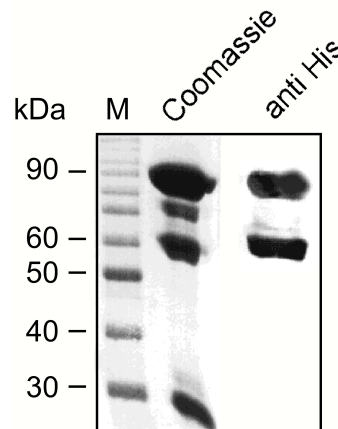
Die vielen funktionellen und strukturellen Übereinstimmungen beweisen, dass es sich bei der NH<sub>2</sub>-terminalen Domäne von ABA3 tatsächlich um eine L-Cystein-Desulfurase des NifS-Typs handelt. Das Protein mobilisiert einen Schwefel aus dem Substrat L-Cystein und bindet ihn als Persulfid über einen proteineigenen Cystein-Rest. Bis zu diesem Punkt erfüllt ABA3-NifS dieselbe Funktion wie jedes andere NifS-Protein. Dennoch wird der Schwefel im Fall von ABA3 für einen vollkommen anderen Stoffwechselprozess, nämlich die Sulfurierung des Moco zur Verfügung gestellt. Der Verlust der Aktivität von Enzymen, für welche dieser Sulfurierungsschritt essentiell ist, ist bislang die einzig feststellbare Auswirkung eines Defektes von ABA3 in *A. thaliana*.

Es ist anzunehmen, dass die spezifische Verwendung des Schwefels für die Moco-Sulfurierung auf die Fusion von ABA3-NifS mit der C-terminalen ABA3-Domäne, sowie die cytosolische Lokalisierung von ABA3 zurückzuführen ist. In dieser Vorstellung wäre ABA3-NifS als Schwefel-Lieferant und ABA3-CT als eigentliche Moco-Sulfurase anzusehen, da erst diese Domäne über die spezifische Verwendung eines ansonsten universell einsetzbaren Schwefels bestimmt. Da freie Persulfid-Spezies relativ instabil sind und schnell zu einem Thiol und elementarem Schwefel zerfallen (Kessler, 2006), könnte dies die Anwesenheit einer L-Cystein-Desulfurase im Cytosol notwendig machen, wo die Moco-Sulfurierung stattfindet. Die plastidär bzw. mitochondrial lokalisierten NifS-Proteine kommen aufgrund ihres Wirkortes für diese Funktion nicht in Frage.

Die detailliertere Analyse verschiedener Pflanzen im Silbersulfid-Aktivitätsassay erbrachte, dass in jungen Pflanzen keine ABA3-Aktivität feststellbar war. Erst mit fortgeschrittenem Alter (ca. 6 Wochen) entwickelte sich die entsprechende Bande. Das stärkste ABA3-Signal konnte mit bereits seneszenten Pflanzen erzielt werden. Da außerdem der Effekt des Stresses näher untersucht werden sollte, wurden junge Pflanzen einem 24 stündigen Trockenstress ausgesetzt. Auch bei den so vorbereiteten Pflanzen war im Gel die Bildung der ABA3-Aktivitätsbande zu erkennen. Eine Erhöhung der Transkription von *aba3* unter Stressbedingungen konnte schon vorher gezeigt werden (Xiong *et al.*, 2001, Bittner *et al.*, 2001). Die gezeigte Aktivität war nun der erste Beleg dafür, dass auch die Aktivität von ABA3 in der Pflanze unter Seneszenz- sowie Stress-Bedingungen zunimmt. Dies könnte zumindest für ersteres damit erklärt werden, dass in diesem Entwicklungsstadium der Pflanze die Expression und Aktivität von XDH ebenfalls ansteigt (Hesberg *et al.*, 2004; M. Zarepour, pers. Mitteilung). Dadurch besteht ein erhöhter Moco-Sulfurierungsbedarf, der nur durch ABA3 befriedigt werden kann. Das Phytohormon ABA selber spielt ebenfalls eine wichtige Rolle bei der Seneszenz. Der Hauptweg der ABA-Synthese läuft über das Intermediat Abscisin-Aldehyd, welches durch die AO $\delta$  zu ABA umgesetzt wird. Die Aktivität der AO $\delta$  ist

dabei ebenfalls abhängig von der Sulfurierung des Moco und steigt während der Seneszenz stark an (M. Zarepour, pers. Mitteilung).

Bevor ABA3-NifS aber funktionell auf die strikte Abhängigkeit von ABA3-CT reduziert wird, muss geklärt werden, ob ABA3 im Organismus tatsächlich als vollständiges Protein vorliegt oder aber in seine einzelnen Domänen dissoziieren kann. Für letzteres gibt es verschiedene Hinweise. Bei der rekombinanten Expression von ABA3 in *E. coli* wird bei affinitätschromatographischer Aufreinigung über den His-Tag neben dem vollständigen Protein (ca. 90 kDa) auch immer ein ca. 60 kDa großes Spaltprodukt isoliert (Abb. 3.5). Diese Fraktion kann bis zu 50% der Gesamtproteinmenge ausmachen. Das Protein wird von einem Anti-His-Antikörper spezifisch erkannt, wodurch deutlich wird, dass es sich um ein NH<sub>2</sub>-terminales Spaltprodukt handeln muss.



**Abb. 3.6:** **Spaltung von ABA3 in *E. coli*.** Bei der Aufreinigung von ABA3 aus *E. coli* wird ein ca. 60 kDa großes Spaltprodukt mitgereinigt. Es handelt sich um den NH<sub>2</sub>-terminalen ABA3-Bereich, da es mit dem His-Tag fusioniert ist (M. Oreb, Diplomarbeit).

Lokalisierungsexperimente mit ABA3 und den einzelnen Domänen belegen für ABA3-CT eine Lokalisierung im Zellkern (S. Wollers, Diplomarbeit), während ABA3 und ABA3-NifS vorwiegend cytosolisch lokalisiert sind (F. Bittner, Dissertation 2002). Dies lässt auf eine zusätzliche Funktion von ABA3-CT im Kern schließen und bestärkt somit die Vermutung einer Spaltung von ABA3. Da Persulfid-Schwefel in eine Vielzahl verschiedener, biologisch relevanter Stoffwechselprozesse involviert sind (siehe 3.2), kann nicht ausgeschlossen werden, dass ABA3-NifS neben der Moco-Sulfurierung auch an anderen Reaktionen beteiligt ist.

Betrachtet man ABA3-NifS als ein potentiell eigenständiges Enzym *in vivo*, muss auch die cytosolische Fe/S-Cluster-Synthese Erwähnung finden. In *A. thaliana* findet die *de novo*-Fe/S-Cluster-Biosynthese in den Mitochondrien und Plastiden statt (Balk & Lobreaux, 2005). Auch die Fe/S-Cluster cytosolischer Proteine werden in strikter Abhängigkeit von der

mitochondrialen Fe/S-Cluster-Maschinerie gebildet (Balk & Lobreaux, 2005, Lill & Mühlenhoff, 2006), benötigen aber dennoch eine cytosolische Assemblierungs-Maschinerie. Eine direkte Beteiligung an der Synthese von Fe/S-Clustern, eine der Hauptfunktionen vieler NifS-Proteine, konnte für ABA3-NifS bislang nicht gezeigt werden und *aba3*-defiziente Pflanzen zeigen offenbar keine Beeinträchtigung der Fe/S-Proteine. Dennoch ist bemerkenswert, dass über die cytosolische Fe/S-Cluster-Assemblierung bislang wenig bekannt ist und immer wieder neue cytosolische Proteine entdeckt werden, die an diesem Mechanismus beteiligt sind. Es ist somit nicht auszuschließen, dass ABA3-NifS als cytosolische L-Cystein-Desulfurase in diese Prozesse involviert ist. Eventuell käme eine Beteiligung bei der Reparatur cytosolischer Fe/S-Cluster in Frage.

Neben der Funktion als L-Cystein-Desulfurase weist ABA3 aber auch noch eine L-Selenocystein-Lyase-Aktivität auf. Wie über den Aktivitätsnachweis im nativen Gel gezeigt werden konnte, ist diese Aktivität für das native Protein deutlich höher als die entsprechende L-Cystein-Desulfurase-Aktivität. Es kann daher über eine zweite Funktion von ABA3 im Selen-Stoffwechsel spekuliert werden. Selen entwickelt seine Giftigkeit über den unspezifischen Einbau von Selenocystein in Proteine. Experimente zur Überexpression einer L-Selenocystein-Lyase aus der Maus im Cytosol von *Arabidopsis thaliana* ergaben eine erhöhte Selen-Toleranz dieser Pflanzen (Pilon et al., 2003). Die entsprechende Überexpression im Plastiden führte nicht zu diesem Ergebnis (Pilon et al., 2003). Dies könnte bedeuten, dass das Cytosol der Ort für die Selen-Detoxifizierung in der Pflanze ist und ABA3 als cytosolische L-Selenocystein-Lyase bei diesem Prozess mitwirkt.

Auf der anderen Seite spielen Selenocystein-Reste in einigen Enzymen eine wichtige Rolle. So konnten für den Glycin-Reduktase-Komplex aus *Clostridium sticklandii* (Cone et al., 1976), die Formate-Dehydrogenase aus *Methanococcus vannielii* (Jones et al., 1979) und *E. coli* (Zinoni et al., 1986) sowie Glutathion Peroxidase aus der Ratte (Forstrom et al., 1978) die Beteiligung von L-Selenocystein-Resten an der Enzymaktivität gezeigt werden. Für L-Selenocystein-Lyasen wird in diesem Zusammenhang vorgeschlagen, dass sie ein Selenid für die Selenophosphat-Synthetase zu Verfügung stellen (Lacourciere et al., 1998). Selenophosphat wiederum stellt einen Vorläufer für die Selenocysteyl-tRNA dar (Forchhammer et al., 1991), die den spezifischen Einbau von Selenocystein in die entsprechenden Proteine gewährleistet.

Für längere Zeit war über die Existenz von Seleno-Proteinen in Pflanzen nichts bekannt, bis schließlich in der einzelligen Alge *Chlamydomonas reinhardtii* eine Selenocystein-abhängige Glutathion-Peroxidase entdeckt wurde (Fu et al., 2002). Es kann somit nicht ausgeschlossen werden, dass auch in höheren Pflanzen die entsprechende Maschinerie vorhanden ist. Da die Translation und somit auch der Einbau des Selenocysteins in die Proteine im Cytosol

erfolgt, sollte auch die entsprechende Maschinerie hier lokalisiert sein. Für ABA3 käme dabei eine Funktion als Selenid-Lieferant in Frage.

ABA3 aus *A. thaliana* ist somit eine L-Cystein-Desulfurase des NifS-Typs, die im Zusammenspiel aus NH<sub>2</sub>-terminaler und C-terminaler Domäne ihre Funktion als Moco-Sulfurase erfüllt und damit eine wichtige Rolle bei der Regulation des Stoffwechsels von *A. thaliana* insbesondere unter Stressbedingungen einnimmt. Neben dieser Hauptfunktion gibt es Anlass zu der Vermutung, dass beide Domänen für sich genommen weitere Aufgaben erfüllen. Dabei kommt für ABA3-CT eine Funktion im Kern, für ABA3-NifS unter anderem eine Beteiligung am Selen-Stoffwechsel oder der cytosolischen Fe/S-Cluster-Maschinerie in Frage.

## 4. Material und Methoden

### 4.1 Materialien

#### 4.1.1 Verwendete *E. coli*- und *P. pastoris* Stämme

Tab. 4.1: Verwendete *E. coli*- und *P. pastoris* Stämme

Stamm	Genotyp	Referenz	Kultivierung	Verwendung
<b><i>E. coli</i></b>				
DH5 $\alpha$	F <sup>-</sup> supE44 $\Delta$ lacU169 ( $\phi$ 80 lacZ $\Delta$ M15) hsdR17 endA1 gyrA96 thi-1 relA1 recA56	Hanahan (1983)	37°C, LB	Klonierung
DL41 (DE3)	F <sup>-</sup> metA28 LAM -	Hendrickson, Horton & Lemaster, (1990)	37°C, LB	Expression
RK4353	F <sup>-</sup> araD139 $\Delta$ (argF-lac)U169 deoC1 flbB5201 gyrA219 rel A1 rpsL150 nob-9 ptsF25	Stewart & MacGregor (1982)	37°C, LB	
RK5204	RK4353 <i>chlA204::Mu cts</i>	(V. Stewart), Rivers et al., 1993	30°C, LB	Expression
RK5206	RK4353 <i>chlG206::Mu cts</i>	Stewart & MacGregor (1982)	30°C, LB	Expression
XL1-Blue	$\Delta$ (mcrA)183 $\Delta$ mcrB-hsdSMR-mrr)173 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lacIqZ $\Delta$ M15 Tn5 (Kan <sup>R</sup> )].	Stratagene	37°C, LB	Klonierung
TP1000	F <sup>-</sup> , lacU169, araD139, rpsL150, relA1, ptsF, rbsR, flbB, $\Delta$ (mobAB), Strep. R.	Palmer (1996)	37°C, LB	Expression
<b><i>P. pastoris</i></b>				
KM71	Arg4, his4, aox1::ARG4	Invitrogen	30°C, YPD	Expression



#### 4.1.2 Plasmide

Tab. 4.2: Plasmide

Plasmid	Selektion	Referenz	Verwendung
pQE80	amp	Qiagen	Expression
PBluescript II SK+	amp, Blue-White	Stratagene	Klonierung, Sequenzierung
PGEM-T easy	amp, Blue-White	Promega	PCR-Klonierung
pJET1/blunt	Ampicillin	MBI Fermentas	PCR-Klonierung

#### 4.1.3 Expressionskonstrukte

Tab. 4.3: Expressionskonstrukte

Klon	Exprimiertes Protein	Exprimierte Aminosäurepositionen	MW (kDa)
pQE80-ABA3	ABA3-FL	1-819	90
pQE80-ABA3-NifS	ABA3-NifS	1-507	55,7
pQE80-ABA3-CT	ABA3-CT	513-819	35
pQE80-HMCS	HMCS-FL	1-888	97,7
pQE80-HMCS-NifS	HMCS-NifS	1-507	55,7
pQE80-HMCS-NifS + Linker	HMCS-NifS+Linker	1-566	62,2

#### 4.1.4 Primer

Alle verwendeten Primer wurden entweder von Sigma oder Eurogentec bezogen.

Tab. 4.4: Primer

Primer	Verwendung	Sequenz
<b>ABA3</b>		
nifs-start-BamHI/NcoI	PCR	TTTCTTGGATCCATGGAAGCATTTCTTAAGGAATTC
nifs-stop-BamHI	PCR	ATATATGGATTCTCAGGTTCCATTCCCAGTCTTCTT
C-term-start-BamHI	PCR	TATATAGGATTCATGCAACTTCTTAGTGAAGACCTTGAA
C-term-stop-BamHI	PCR	CACAAGCGGATCCTTATTCAATATCTGGATTAACTTCTTCCCC
ABA3-C430A+	PCR-Mut.	CGGACAGGATGTTTT <b>GCCA</b> ATCCTGGCGCATGT
ABA3-C430A-	PCR-Mut.	ACATGCGCCAGGATT <b>GGC</b> AAAACATCCTGTCCG
ABA3.K271S+	PCR-Mut.	TCATTCTAC <b>AGC</b> TTATTTGGTTATCCTACTGGG
ABA3.K271S-	PCR-Mut.	ATAACCAAATA <b>AGCT</b> GTAGAATGACAGAACAAC
C435Afor	PCR-Mut.	AATCCTGGCGCAG <b>CT</b> GCAGTATCTCGAG
C435Arev	PCR-Mut.	CTCGAGATACTTTGC <b>AGCT</b> GCGCCAGGATT
C428430Afor	PCR-Mut.	CAGTTACGGACAGG <b>AGCT</b> TTT <b>GCCA</b> ATCCTGGC
C428430Arev	PCR-Mut.	GCCAGGATT <b>GGC</b> AAA <b>AGC</b> TCCTGTCCGTAAC TG
ABA3.G469E+	PCR-Mut.	GGAAAACCAACAG <b>AGG</b> CTGTTAGGGTTTTCG
ABA3.G469E-	PCR-Mut.	CGAAACCCTAACAG <b>CTCT</b> GTGTTGGTTTTCC
Thr301Ile_for	PCR-Mut.	GACTTATTTTAGTGGAGGC <b>ATT</b> GTGCTGCTTCAATTGC
Thr301Ile_rev	PCR-Mut.	GCAATTGAAGCAGCAAC <b>AAT</b> GCCTCCACTAAAATAAGTC
<b>HMCS</b>		
HMCS 1512+	PCR	CTGTCCCTCAGGCCCATGCTG
HMCS-ct3'BamHI	PCR	TTAGGAGGTAACATCCTGGTGTTTCTC
HMCS_NifS_Fusion	PCR	TGATGGGGCTCCAGTCTCCCCGGTGTCAGCATGGGC
HMCS-NifS_Link	PCR	ATATATGGATCCTCAAGGAGTCGGCTGGGTTCTGGCGAC
C424A_for	PCR-Mut.	CGAACTGGCTGCTTC <b>GCT</b> AACACTGGGGCCTGC
C424A_rev	PCR-Mut.	GCAGGCCCCAGTGTT <b>AGC</b> GAAGCAGCCAGTTTCG

#### 4.1.5 Antikörper

Für den immunologischen Nachweis der rekombinant exprimierten Proteine ABA3 und HMCS wurden polyklonale Antikörper aus Kaninchen (Trenzyme) oder ein Anti-His-Tag-Antikörper aus Maus (Sigma) verwendet. Zunächst wurden die von der Firma Trenzyme hergestellten Anti-Seren gegen ABA3 einem Reinigungsschritt zur Verbesserung der Antikörper-Qualität unterzogen. Ein weiteres Ziel war hierbei, spezifisch gegen die separat exprimierten ABA3-Domänen (ABA3-NifS und ABA3-CT) gerichtete Antikörper anzureichern. Die so aufgereinigten Antikörper wurden, wenn nicht anders angegeben, in einer 1:7500 Verdünnung verwendet, der Maus-Antikörper in einer 1:1000 Verdünnung.

Als sekundärer Antikörper wurde Alkalische Phosphatase-gekoppelter Antikörper gegen Kaninchen-IgG oder Maus-IgG (Sigma) aus der Ziege in einer 1:7500 bzw 1:3000-Verdünnung verwendet. Eine Auflistung aller verwendeten Antikörper ist in Tabelle zu sehen.

**Tab. 4.5: Verwendete Antikörper**

Bezeichnung	Mono- / Polyklonal	Organismus	Verdünnung	Hersteller
Primäre Antikörper				
anti-ABA3-NifS	Polyklonal	Kaninchen	1:7500	Trenzyme
anti-ABA3-CT	Polyklonal	Kaninchen	1:7500	Trenzyme
anti- His <sub>6</sub> -Tag	Monoklonal	Maus	1:1000	Sigma
Sekundäre Antikörper				
anti-Kaninchen	Polyklonal, AP-Konjugat 1)	Ziege	1:7500	Sigma
anti-Maus	Polyklonal, AP-Konjugat 1)	Ziege	1:3000	Sigma

1) AP-Konjugat = Alkalische Phosphatase-Konjugat

#### 4.1.6 Häufig verwendete Chemikalien, Enzyme und Matrices

Die in speziellen Versuchen häufig eingesetzten Chemikalien sind nach Hersteller sortiert in der unten gezeigten Tabelle aufgeführt. Die übrigen gängigen Laborchemikalien wurden von den Firmen Riedel-de Haen, Roth, Sigma, Merck, Fluka, Serva und Duchefa bezogen.

**Tab. 4.6: Häufig verwendete Chemikalien, Enzyme und Matrices**

<b>Hersteller</b>	<b>Chemikalien</b>
Aldrich	L-Cystein, Natriumsulfid, Indol-3-Carboxaldehyd, Ammonium-Eisen(III)-Sulfat
Duchefa	DTT, IPTG
Fluka	Selenocystin
Merck	Imidazol, Silbernitrat
Roth	Acrylamid/Bisacrylamid (30%), Triton X 100
Sigma	1,5-I-AEDANS, Pyridoxalphosphat, DMPD, MTT
<b>Enzyme</b>	
Biozyme	Xanthinoxidase
Fluka	Lactat-Dehydrogenase
Peqlab/Promega	Taq-Polymerase
Peqlab	Pwo-DNA-Polymerase
Sigma	Glutamat-Pyruvat-Transaminase
<b>Matrices</b>	
Amersham	Q-Sepharose, Source 15Q
Pharmacia	Superdex 200
Qiagen	Nickel-NTA-Agarose

#### 4.1.7 Geräte, Materialien und Software

Die für die Versuchsdurchführungen notwendigen Geräte, Software und Materialien sind in den unten stehenden Tabellen zusammengefasst.

**Tab. 4.7: Geräte**

Gerät	Hersteller
Autoklav	Westima Sauter
ABI Prism TM 310 cycle sequencer	PE Applied Biosystems
Äkta Basic 10 System	Amersham
AR-36L Arabidopsis growth chamber	Percival Scientific
Dynamic Light Scatter DynaPro	Proterion Corporation
Fotoeinheit	Intas Mitsubishi
French Pressure Cell Press	Aminco
GC-14 Gaschromatographen	Shimadzu
GenAmp PCR-System 2400	Perkin Elmer
Heizblock Thermostat plus	Eppendorf
HP Series 1100-HPLC	Agilent
Immunoblot-Transfergerät	Micro Bio Tec Brand
VP-ITC	MicroCal
Miniblotter-Apparatur	Biometra
PCR-Express Gradient Cycler	Hybaid
Proteingelelektrophorese SE250	Hoefer
Schüttelinkubator Unitron	Infors
Spektrometer UV/Vis Ultrospec 2100 pro	Pharmacia Biotech
Sterilwerkbank LaminAir	Heraeus
Suprafuge 22	Heraeus
Ultraschall-Gerät Sonifier	Branson
Zentrifugen	Sigma, Heraeus, Hettich

**Tab. 4.8: Material**

<b>Material</b>	<b>Hersteller</b>
ABI-Prism™-Big-Dye-Terminator-Cycle-Sequencing-Ready-Reaction Kits	(Perkin Elmer) Applied Biosystems
EasyPure DNA Purification Kit	Biozym
Nick-Säulchen	Amersham Bioscience
Nucleo-Spin-Extract-Kits	Macherey und Nagel
Nucleo-Spin-Plasmid-Kits	Macherey und Nagel
ODS Hypersil 120 A Säule	Techlab
PD10-Säulen	Amersham Bioscience
PVDF-Transfer-Membran (Hybond P,	Amersham Bioscience
Q-Sepharose	Amersham Bioscience
Superdex 200 HighLoad 16/60 prep grade	Pharmacia biotech
Superdex 200 HR 10/30 analytical grade	Pharmacia biotech
VivaSpin-Konzentratoren	VivaScience

**Tab. 4.9: Software**

<b>Software</b>	<b>Hersteller</b>
CemStation for LC 3D	Agilent
Swift II	Pharmacia Biotech
Unicorn 5.01	Amersham
Dynamics V6	Proterion Corporation

## **4.2. Molekularbiologisches Arbeiten**

### **4.2.1 Klonierungen**

Alle in dieser Arbeit durchgeführten DNA-Arbeiten hatten die Subklonierung bzw. Umklonierung von DNA-Fragmenten auf Plasmid-Ebene zum Ziel. Dies diente der Erzeugung von Expressionskonstrukten in *E. coli* oder *P. pastoris*.

Die Lagerung und Vermehrung der verwendeten Plasmide erfolgte in dem *E. coli*-Stamm DH5 $\alpha$ . Selbst erstellte Expressionskonstrukte wurden ebenfalls in diesen Stamm transformiert und zur mittelfristigen Lagerung bei -70°C eingefroren. Zur Herstellung neukombinierter Expressionskonstrukte wurden Restriktions-Endonukleasen, T4-DNA-Ligase und Alkalische Phosphatase entsprechend der Herstellerangaben oder nach Sambrook *et al.* (1989) verwendet. Die Aufreinigung der Plasmide erfolgte mit Hilfe des Nucleo-Spin-Plasmid-Kits von Macherey und Nagel.

PCR-Produkte oder andere DNA-Fragmenten wurden in 1%igen Agarosegelen mit 0,5  $\mu$ g/ml Ethidiumbromid in Anlehnung an Sambrook *et al.* (1989) aufgetrennt. Das Ausschneiden der Banden von Interesse erfolgte unter UV-Licht. Die enthaltene DNA wurde mit Hilfe des Nucleo-Spin-Extract-Kits oder dem EasyPure DNA Purification Kit von Biozym aufgereinigt. Die Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen erfolgte ebenfalls nach Sambrook *et al.* (1989).

### **4.2.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)**

Verschiedene Variationen der PCR wurden in Abhängigkeit davon verwendet, welcher Anspruch an die Genauigkeit und Prozessivität der verwendeten Polymerase gestellt wurde. Alle Ansätze entsprachen jedoch den Grundsätzen der Standardprotokolle nach Sambrook *et al.* (1989). Bei Ansätzen mit hoher Genauigkeit wurde die mit einer 3'-5'-Exonuklease-Aktivität ausgestatteten Pwo-DNA-Polymerase (Pqlab) verwendet. Bei geringeren Ansprüchen an die Genauigkeit wurde die Taq-Polymerase (Pqlab, Promega) eingesetzt. Für alle PCR-Ansätze wurden die Geräte Gen Amp PCR-System 2400 von Perkin Elmer sowie PCR-Express Gradient von Hybaid eingesetzt.

#### 4.2.2.1 Klonierungs-PCR

Diese Technik basiert auf der Verwendung mutagenisierter Primer, um für die Erstellung von Expressionskonstrukten neue Restriktionsstellen an definierten Positionen in einer cDNA zu erzeugen. Diese sind notwendig, um die cDNA richtig positioniert in ein Plasmid klonieren zu können.

Der erste Schritt zur Modifizierung der cDNA war das Design von Primern. Diese beinhalteten die gewünschten Basenaustausche, verfügten aber über genug Sequenzhomologie, um an die Template-DNA spezifisch zu binden. Ein PCR-Ansatz enthielt in einem Gesamtvolumen von 50 µl 1 µM jedes Primers, 200 mM jedes Nucleotids, 20-50 ng Template-DNA und 2,5 U Pwo-DNA-Polymerase. Die Amplifikation erfolgte unter variierenden Bedingungen in Abhängigkeit von der eingesetzten cDNA. Das Standardprotokoll für viele PCR-Ansätze sah einen einmaligen Denaturierungsschritt bei 95°C für 2 min vor. Darauf folgten 18-20 Zyklen aus Denaturierung (95°C, 30 s), Annealing (56°C, 30 s) und Elongation (72°C, 2 min). Die Endsynthese fand für 7 min bei 72° C statt.

#### 4.2.2.2 Fusions-PCR

Diese spezielle PCR wurde verwendet, um Sequenzfehler in einer cDNA zu eliminieren oder um Mutationen in eine bestehende cDNA einzufügen. In der Regel wurden mit dieser Methode Expressionskonstrukte modifiziert, um mutagenisiertes Protein herstellen zu können. Dazu wurden zunächst mittels PCR mindestens zwei DNA-Fragmente erzeugt, die in einem gewissen Bereich überlappen. Sollten neue Mutationen erzeugt werden, lagen die Basenaustausche meistens in diesen Überlapp-Bereichen, welche durch den 5'-Primer des einen und den 3'-Primer des anderen Fragments gebildet werden. Beide Primer waren somit komplementär zueinander und gewährleisteten so die spätere Fusion der einzelnen Fragmente. Beide Primer mussten die ausgetauschte Base enthalten, um sicherzustellen, dass später beide DNA-Stränge des Produkts ebenfalls diese Mutation tragen.

Nach der Synthese der beiden Einzelfragmente wurde der eigentliche Fusions-PCR-Ansatz gestartet. In einem ersten Denaturierungsschritt gefolgt von einer Annealing-Phase lagern sich dabei die Fragmente in ihren komplementären Bereichen aneinander. In Anwesenheit von Nukleotiden und Pwo-Polymerase werden diese DNA-Stränge dann zu Doppelstrang-DNA aufgefüllt. Die Zugabe endständiger Primer und weitere PCR-Zyklen führen dann zur Amplifikation des gesamten DNA-Fragments. Als Richtlinien können folgende Werte dienen: Je 20 ng Teilfragment wurden in Anwesenheit von 2,5 U Pwo-Polymerase und je 200 ng



dNTP bei 94°C für 2 min denaturiert. Nun folgten 5 Zyklen von je 30 s Denaturieren bei 94°C, 30 s Annealing bei 56°C und 30 s Elongation bei 72°C. Dann wurden die endständigen Primer jeweils 1 µM konzentriert zugegeben. Das Programm durchlief nun 15 Mal den oben beschriebenen Zyklus mit einer abschließenden Endsynthese von 7 min bei 72°C.

#### **4.2.3 DNA-Sequenzierung**

Für die Sequenzierung wurde stets hochreine DNA eingesetzt. Die Aufreinigung erfolgte im Fall von Plasmid-DNA mit Hilfe des Nucleo-Spin-Plasmid-Kits (Macherey & Nagel), im Fall von PCR-Amplifikat mit dem Nucleo-Spin-Extract-Kit (Macherey & Nagel). Die Sequenzierung selbst erfolgte unter Verwendung von fluoreszenz-markierten ddNTPs des ABI-Prism™ Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kits (Perkin Elmer) mit einem Pop 6 Polymer auf einem ABI Prism™ 310 cycle sequencer (PE Applied Biosystems). Mit einem Teil der Sequenzierungen wurde die Fima MWG beauftragt. Dazu wurden 2 µg reine DNA getrocknet und als Pellet versendet. Die Primer wurden, wenn es sich um eigene Primer handelte, als 10 mM Gebrauchslösung mitverschickt. Die Sequenzierdaten wurden dann durch MWG über das Internet verfügbar gemacht.

#### **4.3 Arbeiten mit *Arabidopsis thaliana***

Die in dieser Arbeit analysierten *aba3*-Mutanten (*aba3-1*, *aba3-2*, *aba13-5*) wurden freundlicherweise durch Annie Marion-Poll vom „Institut National de la Recherche Agronomique“ (INRA) für die Arbeiten von Florian Bittner zur Verfügung gestellt und standen somit auch für diese Arbeit zur Verfügung. Die korrespondierenden Wildtypen Columbia (Col-0), Landsberg erecta (Le) sowie Wassilewskija (Ws) lagen ebenfalls bereits vor.

### 4.3.1 Pflanzenanzucht

Aussaaterde (z.B. Compo) wurde in kleine Pflanztöpfe (7 x 7 x 8cm) verbracht und sehr gut durchnässt. Diese Erde wurde mit ca. 100 Pflanzensamen bestreut. Zum Schutz vor Austrocknung wurden die Töpfe mit Frischhaltefolie abgedeckt oder in ein Mini-Gewächshaus gestellt. Zunächst mussten die Samen eine ein- bis zweitägige Keimungsinduktion bei 4°C durchlaufen. Danach wurden sie in einen Kulturschrank mit definierten Kulturbedingungen überführt. Für diese Arbeit wurde ein AR-36L Arabidopsis growth chamber (Percival Scientific) verwendet. Die Kultivierung der Pflanzen erfolgte zunächst für ca. 2 Wochen unter Langtagbedingungen. Darunter versteht man 16 Stunden Lichtphase bei 22°C und 8 Stunden Dunkelphase bei 20°C bei einer relativen Luftfeuchtigkeit von 50-60%. War eine kräftige Rosette ausgebildet, wurden die Bedingungen auf Kurztag umgestellt. Dies beinhaltete eine Verkürzung der Lichtphase auf 9 Stunden bei 22°C und eine Verlängerung der Dunkelphase auf 15 Stunden bei 20°C. Die Luftfeuchtigkeit wurde beibehalten. Damit beabsichtigte man eine Verzögerung der Blütenbildung. *A. thaliana* ist eine Langtagpflanze und in der Lage, zwischen Lang- und Kurztagbedingungen zu unterscheiden, was sich hinsichtlich der Blühinduktion auswirkt. Unter Langtagbedingungen wird ab dem 20. Tag die Blütenbildung eingeleitet. Unter Kurztagbedingungen wird sie jedoch unterdrückt. Die Pflanze bekam so die Möglichkeit, länger vegetativ zu wachsen und eine kräftige Rosette auszubilden. Für die parallele Anzucht von Mutanten traten jedoch Probleme auf. Die *aba3*-Mutanten weisen aufgrund des Abscisinsäure-Mangels eine gestörte Stomataregulation auf. Auch treten diese Pflanzen 5 bis 10 Tage früher in die Blühphase ein. Dem konnte entgegengewirkt werden, indem man die Mutanten während des Wachstums über einen möglichst langen Zeitraum einer höheren Luftfeuchtigkeit (ca. 70-80%) aussetzte.

### 4.3.2 Ernte und Verarbeitung des Pflanzenmaterials

Für die Erstellung von Rohextrakten wurden entweder Teile einer Pflanze entnommen oder die gesamte Pflanze zunächst von Erdresten gereinigt.

Um diese Proben auch langfristig nutzen zu können, wurde entnommenes Material in flüssigem Stickstoff weggefroren und bei -70°C gelagert. Dabei wurden sowohl das unbehandelte Pflanzenmaterial als auch fertige Rohextrakte gelagert. Zur Herstellung eines Rohextraktes wurde eine abgewogene Menge ausgewähltes Pflanzenmaterial in flüssigem Stickstoff gemörsert und anschließend mit 1-2 Volumen eines geeigneten Probenpuffers (z.B. 100 mM Natrium-Phosphat-Puffer, pH 7,2) versetzt. Bei Bedarf wurde in diesem Puffer

bei 4°C ein zweites Mal gemörsert, bis eine homogene Masse entstand. Dieses Material wurde bei 11000 x g zentrifugiert und der Überstand entweder frisch verarbeitet oder wie oben beschrieben gelagert.

#### **4.4 Proteinbiochemisches Arbeiten**

##### **4.4.1 Überexpression rekombinanter Proteine in *E. coli***

Die Expressionsbedingungen für die hergestellten Konstrukte variierten in Abhängigkeit der angestrebten Proteinausbeute bzw. Reinheit sowie der Saturierung der Proteine mit Cofaktoren. Dabei wurde der Expressionsstamm, die Temperatur, die IPTG-Konzentration, die Expressionszeit sowie die Versorgung der Zellen mit Sauerstoff variiert.

Das Standard-Expressionsprotokoll sieht die Verwendung des *E. coli*-Stammes DH5 $\alpha$  und des Expressionsplasmids pQE80 vor. Dieses Plasmid vermittelt den Zellen eine Ampicillin-Resistenz. Zudem wird dem exprimierten Protein NH<sub>2</sub>-terminal ein aus sechs Histidinresten bestehender Tag (His-Tag) angehängt. Dieser ermöglichte die spätere Proteinaufreinigung über Affinitätschromatographie.

Zunächst wurde eine Über-Nacht-Kultur angesetzt, indem mit einer Impföse etwas Zell-Material von einer Glycerolkultur abgenommen und in einem Reagenzglas mit 5 ml Kulturmedium (LB mit 40  $\mu$ g/ml Ampicillin) geschüttelt wurde. Diese Kultur ließ man über Nacht bei 37°C wachsen. Die Hauptexpressionskultur, die bis zu sechs Liter umfassen kann, wurde zu je 500 ml in 1L-Kolben aufgeteilt. Jeder Kolben wurde mit 500  $\mu$ l der Vorkultur angeimpft und unter Schütteln bei 37°C bis zu einer optischen Dichte (OD<sub>600</sub>) von 0,5 wachsen gelassen.

Die Induktion erfolgte durch die Zugabe von 0,1 mM IPTG. Die Expression fand anschließend über den Zeitraum von 18 h bei 37°C unter Schütteln statt.

Die Aufarbeitung der Kulturen begann mit der Pelletierung der Zellen bei 12000 x g für 5 min bei 4°C. Die Zellpellets wurden anschließend in 1-2 Volumen Lysispuffer (50 mM Natrium-Phosphat-Puffer pH 8,0; 300 mM NaCl; 10 % Glycerol; 10 mM Imidazol) resuspendiert. Der Zellaufschluss erfolgte mittels der French Pressure Cell Press. Bei einem Druck von 1000 psi werden die Zellen durch ein enges Ventil gepresst. Durch die dabei auftretenden Scherkräfte brechen sie auf und der Zellsaft wird freigesetzt. Dieser Schritt wird bei Bedarf mehrfach (in der Regel zwei Mal) wiederholt. Um den erhaltenen Extrakt weiter zu homogenisieren, kann ein Sonifizierungsschritt angefügt werden. Ein anschließender Zentrifugationsschritt bei 40.000 x g für 30 min bei 4°C separierte die Zelltrümmer von dem Zellsaft. Der so erhaltene

klare Extrakt kann für weiterführende Experimente eingesetzt werden. So konnten z.B. nun die rekombinant exprimierten Proteine aufgereinigt werden.

#### 4.4.2 Überexpression rekombinanter Proteine in *P. pastoris*

Die Expression eukaryontischer Proteine kann es notwendig machen, trotz des Mehraufwandes auf ein eukaryontisches Expressionssystem zurückgreifen zu müssen. Der Grund hierfür sind posttranslationale Modifikationen des Proteins, welche in einem prokaryontischen System wie *E. coli* nur unzureichend vollzogen werden können. Protein-Fehlfaltung kann dabei die Folge sein. Hier bietet sich die einzellige Hefe *P. pastoris* wegen der kurzen Generationszeit und leichten Kultivierbarkeit an. Zudem verfügt dieser Organismus über alle nötigen Mechanismen und das passende Milieu, um die Eukaryontenspezifischen Modifikationen des exprimierten Proteins vorzunehmen.

*P. pastoris* zeichnet sich durch die Fähigkeit aus, Methanol als einzige Kohlenstoffquelle zu nutzen. Dabei wird Methanol von zwei Isoformen des Enzyms Alkohol-Oxidase (AOX1 und AOX2) unter Sauerstoffverbrauch zu Formaldehyd oxidiert. Da bei dieser Reaktion als Nebenprodukt  $H_2O_2$  entsteht, findet sie in den Peroxisomen statt, um der Radikalbildung vorzubeugen. Ist *P. pastoris* auf Methanol als alleinige Kohlenstoffquelle angewiesen, wird die Expression der involvierten Enzyme deutlich verstärkt. Die AOX1 repräsentiert unter diesen Bedingungen bis zu ca. 30% der gesamten löslichen Proteinfraction. Dies setzt einen starken, durch Methanol induzierbaren Promotor voraus. Diesen somit gezielt induzierbaren Promotor kann man sich für die Fremdgenexpression in *P. pastoris* zunutze machen. Basierend auf genau diesem Promotor wird das pPICZ-Vektor-System von Invitrogen angeboten. Das Plasmid kann in *E. coli* direkt vervielfältigt werden, was in *P. pastoris* nur nach Intergration ins Genom möglich ist. Dabei vermittelt der Vektor beiden Organismen eine Zeocin<sup>TM</sup>(Invitrogen)-Resistenz, was die Selektion ermöglicht. Zudem wird dem exprimierten Protein C-terminal ein His-Tag angehängt, wodurch es später über eine Nickel-NTA-Matrix aufgereinigt werden kann. Der Vektor selbst kann nur in *E. coli* repliziert werden. Für die Vervielfältigung der DNA in *P. pastoris* muss diese zunächst in das Genom integriert werden. Um diese stabile Intergration zu erreichen, muss die DNA zuerst im Bereich des AOX1-Promotors linearisiert werden. Nach Transformation von *P. pastoris* mit dieser DNA kommt es in der Regel durch homologe Rekombination mit einem single-cross-over zu einer Intergration der rekombinanten DNA im 5' Bereich des AOX1-Gens.

Für die Expression der Aldehydoxidase AAO1 aus *A. thaliana*, welche als Homodimer die AO $\alpha$  bildet wurde ein *P. pastoris*-Stamm verwendet, der von Tomokazu Koshiba von der

Tokyo Metropolitan University in Japan zur Verfügung gestellt wurde. Beschrieben wurde dieser Stamm detailliert durch Koiwai et al. (2000). Es handelt sich dabei um den Mut<sup>S</sup> (Methanol utilisation slow)-Stamm KM71 (Invitrogen), der mit pPICZ-AAO1 transformiert worden war. In diesem Stamm ist das AOX1-Gen durch eine Insertion zerstört, so dass nur die AOX2-Isoform Methanol metabolisieren kann. Dies resultiert in einem deutlich verlangsamten Wachstum.

#### 4.4.2.1 Überexpression der AO $\alpha$ aus *A. thaliana* in *P. pastoris*

Nur die anfängliche Vermehrung der Kolonien von *P. pastoris* findet auf Glucose-haltigem Medium (YPD-Platten) statt. Alle folgenden Flüssigkulturen vor Induktion mit Methanol enthalten ausschließlich Glycerol als Kohlenstoffquelle. Dadurch kommt es zu einer Derepression des AOX1-Promotors. Erst wenn die gewünschte Zelldichte erreicht ist, werden die Zellen Zwecks Induktion in Methanol-haltiges Minimalmedium überführt. Für die Metabolisierung von Methanol muss Sauerstoff zur Verfügung gestellt werden. Die Kulturen werden daher ab diesem Zeitpunkt in Schikanekolben geschüttelt und lediglich mit Gaze verschlossen.

YPD-Medium:	20 g/l	Pepton
	10 g/l	Hefe-Extrakt
	pH 5,8 einstellen, auf 950 ml auffüllen und autoklavieren	
	Festmedium enthält 1,5% Agarose	
	50 ml	40%ige Glucose (sterilfiltriert) zugeben

BMGY-Medium:	20 g/l	Pepton
	10 g/l	Hefe-Extrakt
	autoklavieren und folgendes steril zugeben:	
	100 ml/l	1M Kalium-Phosphat-Puffer, pH 6,0
	100 ml/l	10x YNB
	2 ml/l	500x Biotin
	100 ml/l	10x Glycerol

BMMY-Medium:	wie BMGY, aber statt 10x Glycerol werden 5 ml/l Methanol und 0,3 mM Na-Molybdat zugegeben	
--------------	-------------------------------------------------------------------------------------------	--

#### 4.4.2.2 Proteinextraktion aus *P. pastoris*

Mit dem standardmäßigen Zellaufschluss mittels French Press kann für das Pichia-Zellmaterial nicht immer ein befriedigendes Ergebnis erzielt werden. Daher fand hier eine alternative Aufschlusstechnik Anwendung. Die Zellpellets wurden mit einem Volumen säuregewaschener Glasperlen versetzt, bevor 1 Volumen Lysispuffer (50 mM Natrium-Phosphat-Puffer, pH 7,5; 1 mM EDTA; 5% Glycerol) zugegeben wurde. Diese Suspension wurde 30 Mal für 30 Sekunden gevortext, wobei jedes Mal eine Pause von 30 Sekunden auf Eis einzuhalten war. Die Trennung von den Glasperlen erfolgte über einen Zentrifugationsschritt bei 4000 x g für 5 min bei 4°C. Die Überstände wurden bei 40000 x g für 30 min bei 4°C erneut zentrifugiert. Das klare Lysat konnte dann für die Proteinaufreinigung über Ni-NTA-Matrix verwendet werden.

#### 4.4.3 Affinitätschromatographische Aufreinigung von His-getagten Proteinen

Bei dieser Methode macht man sich zunutze, dass Polyhistidine eine hochaffine Bindung mit Nickel-Ionen eingehen. Der aus 6 Histidinen bestehende His-Tag ist bei Verwendung des Expressionsplasmids pQE80 NH<sub>2</sub>-terminal an das exprimierte Protein fusioniert. Für die Aufreinigung der Proteine müssen zunächst die Nickel-Ionen in eine immobilisierte Form gebracht werden. Hierzu wurde die Nitrilo-tris-Acetat (NTA) Superflow Matrix von Qiagen verwendet. Die vom Hersteller gelieferte Matrix hat bereits Nickel-Ionen chelatiert und kann direkt verwendet werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei unterschiedliche Vorgehensweisen angewendet, um das Protein an die Matrix binden zu lassen. Bei der ersten Methode wird eine leere 15 ml-Tropfsäule unten mit einer Fritte verschlossen und dann mit der benötigten Menge Nickel-NTA-Matrix (Bindungskapazität 10 mg/ml) befüllt. Die Oberfläche der Matrix wird ebenfalls mit einer Fritte bedeckt. Die so selbstgepackte Säule wird mit Lysispuffer äquilibriert, bevor der Extrakt aufgetragen wird. Während dieser langsam einsinkt, hat das getagte Protein genug Zeit, mit der Matrix zu interagieren. Das Protein bindet dabei nicht gleichförmig an die gesamte Matrix. Erst wenn die oben gelegenen Bindungsstellen abgesättigt sind, dringt das Protein zu niedriger gelegenen Bindungsstellen vor.

Die zweite Methode sieht die Mischung der mit Lysispuffer äquilibrierten Matrix mit dem Extrakt vor. Hierbei wird in einem ausreichend großen Gefäß die Matrix mit dem Extrakt unter Schwenken bei 4°C für 1 Stunde inkubiert. Dabei bindet das getagte Protein gleichmäßig an die gesamte Matrix. Das Gemisch wird danach, vergleichbar mit Methode

eins, in eine mit einer Fritte verschlossene Leersäule gefüllt. Die Flüssigkeit kann so nach unten abtropfen. Die Matrix bleibt zurück. Auch hier wurde vor dem Waschschrift eine Top-Fritte auf die Matrix gelegt, um ein Aufwirbeln der Matrix zu vermeiden.

Das Waschen der Matrix erfolgte mit mindestens dem dreifachen Volumen Waschpuffer (50 mM Natrium-Phosphat-Puffer pH 6,0; 300 mM NaCl; 10% Glycerol; 20 mM Imidazol). Durch die leicht erhöhte Imidazolkonzentration des Waschpuffers eluieren Verunreinigungen und unspezifisch gebundene Proteine von der Matrix.

Die Elution des rekombinant exprimierten Proteins erfolgt durch die Zugabe von Elutionspuffer (50 mM NaPi pH 6,0; 300 mM NaCl; 10% Glycerol; 500 mM Imidazol). Dabei verdrängt das in hohen Konzentrationen vorhandene Imidazol als Kompetitor den His-Tag von den Nickel-Ionen. Bei der Aufreinigung farbloser Proteine bietet sich eine fraktionierte Elution in festgelegten Volumenschritten an, da das Protein nicht optisch verfolgt werden kann. Dabei wird mehrfach ein kleines Volumen Elutionspuffer auf die Säule geladen und die Eluate jeweils einzeln aufgefangen. Hierbei ist eine nachfolgende Analyse der Eluat-Fractionen in einem SDS-Acrylamidgel nötig um die proteinhaltigen Fractionen zu identifizieren. Bei durch Chromophoren gefärbten Proteinen kann es sich als vorteilhaft erweisen, das Protein tropfenweise zu eluieren und nur die proteinhaltigen Tropfen zu vereinigen. Dies führt zu einer Minimierung des Elutionsvolumens und somit zu einer höheren Proteinkonzentration. Auch hier sollte aber eine Analyse der Fractionen in einem Gel erfolgen, da zu diesem Zeitpunkt noch keine Aussagen über die Reinheit des Proteins gemacht werden kann.

#### **4.4.4 Bestimmung der Proteinkonzentration**

Die für diese Arbeit gewählte Standardmethode zur Bestimmung der Proteinkonzentration war der Assay nach Bradford (1976). Zum Abgleich der Proteinmengen wird eine Standardreihe mit Rinderserum-Albumin (BSA) verwendet. Die Bradford-Stammlösung (Biorad) wird vorbereitend im Verhältnis 1:5 mit ddH<sub>2</sub>O verdünnt und durch einen Faltenfilter gegeben. Die Lösung ist nun gebrauchsfertig. Der lineare Messbereich des Photometers gibt vor, dass maximal 20 µg Protein in 1 ml der Bradfordlösung verdünnt werden. Nach einer 10-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur erfolgt die Messung der Absorption bei 595 nm gegen eine Protein-freie Kontrolle.

#### **4.4.5 Konzentrierung von Proteinlösungen**

Die Erhöhung der Proteinkonzentration erfolgte über der Verwendung von Zentrifugations-Konzentratoren. Hierbei wird die Probe durch Zentrifugalkräfte durch eine semipermeable Membran gepresst. Die niedermolekularen Substanzen können diese Membran passieren, während das Protein zurückgehalten wird. In Abhängigkeit von der Proteingröße und dem Probenvolumen werden verschiedene Konzentratoren-Systeme angeboten. Diese unterscheiden sich in dem Volumen sowie in der Porengröße (Molecular Weight Cut-Off; MWCO) der verarbeiteten Membran. Für diese Arbeit wurden ausschließlich VivaSpin-Konzentratoren des Herstellers VivaScience verwendet.

#### **4.4.6 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)**

Um die Bestandteile eines Proteingemischs der Größe nach aufzutrennen, wurde die diskontinuierliche Tris/Glycin-SDS-Gelelektrophorese nach Laemmli (1970) angewendet. Für diese Elektrophorese müssen die Proteine zunächst denaturiert werden. In Anwesenheit von SDS und  $\beta$ -ME entfalten sich die Proteine und sie werden gleichförmig negativ geladen. Im Elektrischen Feld trennen sie sich dann ausschließlich nach ihrer Größe auf. Die Acrylamidkonzentration variierte dabei in Abhängigkeit von der Proteingröße in der Regel von 7,5% bis 15%.

Die Proben wurden vor dem Gellauf mit einem denaturierenden Ladepuffer (50% Glycerol; 3,5% SDS; 15%  $\beta$ -ME; 0,02% Bromphenolblau) versetzt, der die Probe zusätzlich beschwert und so das Beladen der Taschen ermöglichte. Bei Bedarf wurden die Proben bei 95°C für 5 min denaturiert. Die Auftrennung im Gel erfolgte bei 120 bis 200 V, bis die Bromphenolblau-Front die untere Kante des Gels erreichte.

Um die Proteinbanden sichtbar zu machen, wurde das Gel in eine Coomassie-Färbelösung (40% EtOH, 10% HAc, 0,15% Coomassie (w/v)) gelegt. Bei dieser Färbemethode bindet der Farbstoff irreversibel an das Protein. Das Protein denaturiert dabei und wird so im Gel fixiert. Nach ca. einer Stunde wird die Hintergrundfärbung des Gels durch Waschen in Entfärber (40% Ethanol) entfernt. Dabei treten die Proteinbanden deutlich blau hervor.



#### **4.4.7 Native Polyacrylamid-Gelelektrophorese (native-PAGE)**

Manche Versuchsansätze machten es nötig, Proteine im Gel voneinander zu separieren und trotzdem deren native Konformation zu erhalten. Hierzu wurde eine Polyacrylamid-Gelelektrophorese durchgeführt, bei der die Proteine ihre native Konformation beibehalten. Dazu wird ein nativer Ladepuffer (2 M Saccharose; 0,02% Bromphenolblau) verwendet, um die Proben zu beschweren und so das Beladen des Gels zu ermöglichen. Das Gel selber enthält kein SDS oder EDTA. Die Auftrennung im Gel wird nur teilweise durch die Größe des Proteins bestimmt sondern beruht hauptsächlich auf der Eigenladung der Proteine. Diese ist dabei in starkem Maße von dem pH-Wert des Trenngels anhängig. Diese Methode wurde verwendet, wenn später die Aktivität des nativen Proteins im Gel bestimmt werden sollte.

#### **4.4.8 Anionenaustauscher-Chromatographie**

Bei dieser Methode nutzt man die Eigenschaft des Säulenmaterials, negative geladene Teilchen zu binden. Verwendung fand in dieser Arbeit eine selbstgepackte Source Q15-Säule (Amersham) mit einem Volumen von ca. 10 ml.

In Abhängigkeit vom pH-Wert des Puffers haben Proteine positiv oder negativ geladene Reste. Entspricht der pH-Wert dem  $pI$  des Proteins, ist die Nettoladung dieses Proteins gleich null. Liegt der pH darunter, überwiegen die positiven Ladungen, oberhalb des  $pI$  ist das Protein negativ geladen. Der pH-Wert der Lösung wird daher so eingestellt, dass das Protein von Interesse eine negative Nettoladung besitzt. Beim Beschicken der Säule bindet das Protein nun an die Matrix. In Anwesenheit eines negativ geladenen Kompetitor-Ions oder durch Variation des pH-Wertes können die gebundenen Moleküle wieder eluiert werden.

Diese Elution erfolgte in dieser Arbeit über das Anlegen eines Salzgradienten. Dazu wurde ein Niedrigsalz-Puffer (100 mM Natrium-Phosphat-Puffer, pH 7,2; Puffer A) mit steigenden Mengen eines Hochsalzpuffers (100 mM Natrium-Phosphat-Puffer, pH 7,2; 1 M NaCl; Puffer B) gemischt. Die negativ geladenen Cl-Ionen verdrängen dabei mit steigender Effektivität die gebundenen Proteine.

#### **4.4.9 Gelfiltrations-Chromatographie**

Bei diesem Verfahren werden die Proteine nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Bei kontinuierlichem Fluss wird das Protein-Gemisch über eine poröse Matrix geschickt. Dabei haben nicht alle Poren dieselbe Größe, sondern es handelt sich vielmehr um eine Mischung von Poren eines gewissen Größenbereichs. Während des Gellaufs diffundieren kleinere Proteine tendenziell öfter in die Poren, während größere Proteine ungehindert weiterwandern. In Abhängigkeit von den Porengrößen trennt die Säule Proteine in einem vorgegebenen Größenbereich auf. Proteine, die über der Maximalgröße bzw. unter der Minimalgröße liegen, trennen sich nicht. Sie eluieren entweder zusammen im Durchbruch oder am Ende des Laufs. Die Wahl des Säulenmaterials muss also in Abhängigkeit von der Größe des Proteins von Interesse getroffen werden. Einen entscheidenden Einfluss auf das Wanderungsverhalten der Proteine hat außerdem deren dreidimensionale Faltung. So können Proteine des gleichen Molekulargewichts vollkommen unterschiedlich laufen, je nachdem ob sie globulär oder eher linear gefaltet sind. Auf Detergenzien muss bei einem Gelfiltrationslauf verzichtet werden, da sich sonst Micellen bilden, die die Proteine umhüllen und das Laufverhalten dramatisch beeinflussen.

In dieser Arbeit wurde für präparative Zwecke eine Superdex 200 prep grade, für analytische Zwecke eine Superdex 200 10/30 analytical grade verwendet. Das Säulenmaterial trennt Proteine in einem Größenbereich von 60.000 bis 400.000 Dalton. Als Puffer wurde ein 50 mM Natrium-Phosphat-Puffer pH 7,2 mit 50 bis 500 mM NaCl verwendet. Durchgeführt wurde der Gellauf mit einem Äkta Basic 10 System. Die Versuche wurden teilweise bei Raumtemperatur und teilweise bei 4°C durchgeführt.

#### **4.4.10 Umpuffern von Proteinlösungen**

Um unerwünschte niedermolekulare Bestandteile einer Proteinlösung zu entfernen, wurden in dieser Arbeit zwei Methoden angewendet. Eine Möglichkeit bestand in dem Umpuffern über eine Gelfiltrationsmatrix. Dafür wurden Nick-Säulchen bzw. PD10-Säulen von Amersham verwendet. Bei diesem Säulenmaterial werden niedermolekulare Substanzen retardiert, wodurch das Protein früher eluiert. Die Säule wurde mit dem gewünschten Puffer äquilibriert. Bei der Verwendung von Nick-Säulchen wurden bis zu 400 µl Probe, bei PD-10 Säulchen bis zu 2,5 ml Probe aufgetragen. Die Elution erfolgte nach dem Einsinken der Probe mit 500 µl bzw. 3 ml des gewünschten Puffers.

Die zweite Methode ist der Pufferwechsel mittels Zentrifugations-Konzentrator. Dazu wurde die Probe zunächst auf ein kleines Volumen eingeeengt, wie unter 4.4.5 beschrieben. Das Protein wird durch die semipermeable Membran zurückgehalten, die niedermolekularen Substanzen können diese passieren. Anschließend wurde die Probe mit dem gewünschten Puffer wieder aufgefüllt. Dieser Schritt wurde so oft wiederholt, bis die Konzentration unerwünschter Substanzen im Überstand niedrig genug war.

#### **4.4.11 Western-Blot-Analyse**

Eine sehr sensitive Methode für den Nachweis von gering konzentrierten Proteine ist die Detektion mittels Antikörpern.

Hierfür wurden die Proteine bzw. ein Protein-Extrakt zunächst in einer nativen- oder SDS-PAGE aufgetrennt. Das Gel wurde dann für ca. 10 min in Transferpuffer (25 mM Tris/HCl; 20% Methanol, pH 10,4) äquilibriert um die Proteine dann in einem Semi-Dry-Blot-Verfahren auf einer PVDF-Transfer-Membran (Hybond P, Amersham Bioscience) zu immobilisieren. Dazu wurde der Blot wie folgt aufgebaut: drei mit Transferpuffer getränkte Whatman-Papiere wurden auf die Anode des Blotters gelegt. Die mit 100% Methanol hydrophilisierte Membran wurde in Transferpuffer äquilibriert und auf die Whatman-Papiere gelegt. Darauf folgte das Gel, welches für 10 min ebenfalls in Transferpuffer äquilibriert wurde. Den Abschluss bildeten erneut drei getränkte Whatman-Papiere. Der Transfer der Proteine erfolgte bei 0,5 mA/cm<sup>2</sup>. Der Erfolg des Transfers wurde mit einer 5%igen PonceauS-Lösung überprüft. Dieser Farbstoff bindet reversibel an die Proteine, welche dann als rote Banden hervortreten. Zu diesem Zeitpunkt können bei Bedarf die Markerbanden mit Bleistift nachgezogen werden, bevor die Membran wieder durch Waschen in H<sub>2</sub>O oder TBSTXS entfärbt wird. Die Blockierung der freien Bindungsstellen erfolgte in einer 1%igen BSA-TBS-Lösung für 1h bei Raumtemperatur. Die aufgereinigten Erst-Antikörper wurden 1:7500, die anti-His Antikörper 1:1000 in BSA verdünnt. Die Inkubation mit der Membran erfolgte für 1 h bei Raumtemperatur, wobei die Antikörper die Gelegenheit bekommen, spezifisch an das Antigen zu binden. Ungebundener bzw. unspezifisch gebundener Antikörper wurde durch dreimaliges Waschen für 10 min in TBSTXS oder TBST entfernt. Nach einem 5 minütigen Blockierschritt wurde für 1 h mit dem anti-Kaninchen- (1:7500) bzw. anti-Maus-Antikörper (1:3000) als Zweitantikörper inkubiert. Dieser Alkalische-Phosphatase-gekoppelte Antikörper bindet an die repetitiven Sequenzen der schweren Ketten des Erst-Antikörpers. Es wurde erneut gewaschen und durch Zugabe von 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-Phosphat-p-Toluidin

(BCIP) und Nitro-Blau-Tetrazolium (NBT) in Reaktionspuffer (100 mM Tris/HCl, pH 8,8; 100 mM NaCl; 0,2 mM MgCl<sub>2</sub>) die Färbereaktion gestartet.

#### **4.4.12 Antikörper-Aufreinigung**

Oft ist die Qualität der gelieferten Seren nicht ausreichend, um spezifisch das gewünschte Protein zu detektieren. In diesem Fall ist eine Aufreinigung des Antikörpers notwendig. Dabei macht man es sich zunutze, dass unter bestimmten Bedingungen die feste Bindung zwischen Antigen und Antikörper aufgebrochen werden kann.

Gereinigtes Antigen (Protein) wird zunächst auf einer PVDF-Membran immobilisiert. Die Membran wird nachfolgend in dem Antikörper-Serum inkubiert, wobei es zur spezifischen Bindung des Antikörpers an das Antigen kommt. Die Membran wird gewaschen. Anschließend wird durch einen pH-Shift in den stark sauren Bereich die Bindung zwischen Antikörper und Antigen wieder gelöst und der Antikörper kann eluiert werden. Der pH-Wert der Antikörperlösung wird danach neutralisiert. Der so gereinigte Antikörper sollte nun mit hoher Spezifität nur das gewünschte Protein erkennen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde folgendes Protokoll zur Aufreinigung befolgt:

Zwei mg Protein wurden in 10 ml 100 mM Natrium-Phosphat-Puffer pH 7,2 verdünnt. Eine PVDF-Membran wurde auf die passende Größe für einen Schraubfilter zurechtgeschnitten und kurz in Methanol äquilibriert. Die Membran wurde in den Schraubfilter eingespannt und mit 5 ml des passenden Puffers durchspült. Nun wurde mit Hilfe einer 10 ml-Spritze die Proteinlösung durch die Membran gepresst. Der Durchbruch wurde aufgefangen und von der anderen Seite durch den Filter gegeben. Ungebundenes Protein wurde durch einen Waschschriff entfernt, bei dem 10 ml des Probenpuffers durch die Membran gespült wurden. Die Membran wurde aus dem Schraubfilter genommen und in die Blockierungslösung aus 1% BSA und 1% Casein in TBS transferiert. Das Blockieren dauerte 1 h bei Raumtemperatur unter Schwenken. Die so präparierte Membran wurde über Nacht bei 4°C und langsamem Schwenken mit dem Antikörper-Serum inkubiert. Die Membran wurde daraufhin drei mal für 5 min in 10 ml TBSTXS gewaschen, um Serumreste und unspezifisch gebundene Antikörper zu entfernen. Die Elution des Antikörpers erfolgte durch die Inkubation der Membran in 100 mM Glycin/HCl-Puffer pH 2,5 für 30 s. Das so gewonnene Eluat wurde mit 170 µl 100 mM Tris (ungepuffert) neutralisiert. Zur Langzeitlagerung wurden die Antikörper in Kugelform in flüssigem Stickstoff eingefroren.

#### 4.4.13 Slot-Blot-Interaktionsassay

Dieser Assay dient der Sichtbarmachung schwacher Protein-Protein-Wechselwirkungen über den Einsatz spezifischer Antikörper.

Zunächst wird eine PVDF-Membran (6,5 x 6,5 cm) kurz in Methanol äquilibriert und anschließend in ddH<sub>2</sub>O überführt. Dann wird sie in die Multiblotter-Apparatur (Biometra) so eingespannt, dass die Spuren der Länge nach mit Membran abgedeckt werden. In diese Spuren werden nun beliebige Protein-Lösungen gegeben (10 µg pro Spur), die einen der beiden Interaktionspartner enthalten. Das Protein bekommt die Möglichkeit, für 1 h bei 4°C an die Membran zu binden, bevor die Flüssigkeit mit einer Pipette wieder entfernt wird (1. Dimension). Die Spuren werden kurz mit ddH<sub>2</sub>O gespült, bevor die gesamte Membran aus der Apparatur genommen und für 1 h bei 4°C in 10 ml Blockierungslösung (1% BSA + 1% Casein in TBS) überführt wird. Die Membran wird anschließend kurz in ddH<sub>2</sub>O gespült und um 90° zur ersten Dimension gedreht erneut in die Multiblotter-Apparatur eingespannt. Die Spuren werden nun mit Proben des zweiten Interaktionspartners (10 µg pro Spur) beladen (2. Dimension). Die Interaktion erfolgt für 1 h bei 4°C. Die Flüssigkeit wird aus den Spuren entfernt und die Membran in Waschlösung überführt. Ab hier gleicht das Protokoll dem der Western-Blot-Analyse. Verwendet werden hier Erst-Antikörper, die gegen das Protein der zweiten Dimension gerichtet sind.

#### 4.4.14 L-Alanin-Assay

Eine Methode zur Messung der Aktivität von L-Cystein-Desulfurasen ist die Quantifizierung des gebildeten Alanins. In einem zweistufigen enzymatischen Reaktionsablauf kann L-Alanin indirekt und quantifizierbar nachgewiesen werden. Entwickelt wurde dieser Assay durch Zheng *et al.* 1993. In einem ersten Reaktionsschritt wird die Aminogruppe des L-Alanins durch eine Glutamat-Pyruvat-Transaminase (GPT) auf  $\alpha$ -Ketoglutarat übertragen. Dabei entstehen Glutamat und Pyruvat. Das so gebildete Pyruvat wird in einem zweiten Schritt unter NADH-Verbrauch durch die Lactat-Dehydrogenase (LDH) zu Lactat reduziert. Die Abnahme der NADH-Konzentration kann dabei photometrisch bei 340 nm verfolgt werden.

Die Quantifizierung der L-Alanin-Mengen erfolgte über die Erstellung einer Eichgeraden mit definierten L-Alanin-Stammlösungen. Die Enzyme GPT und LDH werden in Schritt 2 und 3 jeweils im Überschuss zugegeben, damit die Quantifizierbarkeit gewährleistet ist. Die Reaktionen müssen vollständig ablaufen und die Enzyme dürfen dabei nicht limitierend

wirken. Dieser Assay ist sensitiv genug, um L-Alanin im mM-Konzentrationsbereich detektieren zu können.

Für die Messung der ABA3-Aktivität wurden standardmäßig 200 µg Protein mit 1 mM Cystein und 1 mM DTT in 400 µl 20 mM Tris/HCl, pH 8,0 für 1 h bei 37°C inkubiert. Über einen Konzentrador wurden die niedermolekularen Bestandteile von der Proteinfraction getrennt. Man verwendete 300 µl dieses Durchflusses für die Inkubation mit 10 mM  $\alpha$ -Ketoglutarat und 1 U GPT bei 37°C für 1 h. In der Zwischenzeit wurde die LDH-Lösung vorbereitet. Dazu wurden 750 µl H<sub>2</sub>O mit 250 µl 1 M Tris/HCl, pH 9,3 und 18 U LDH gemischt. Mit diesem Mix wurden 250 µl der GPT-Reaktion versetzt und unmittelbar vor der Messung auf 30°C erwärmt. Dieser Reaktionsansatz wurde in eine Küvette überführt und unter zügigem Mischen mit 250 µl einer 0,58 mM NADH-Lösung versetzt. Die Abnahme der NADH-Absorption wird für 90 s bei 340 nm verfolgt. Die Steigung der Absorptionskurve im linearen Bereich dient als Grundlage zur Berechnung der L-Alanin-Konzentration.

#### 4.4.15 Methylenblau-Aktivitätsassay

Eine alternative Methode zur Ermittlung der L-Cystein-Desulfurase-Aktivität ist die Quantifizierung des aus L-Cystein mobilisierten Schwefels. Neben L-Alanin entsteht bei der L-Cystein-Desulfurierung ein proteingebundenes Persulfid-Intermediat. In Anwesenheit von DTT wird dieses unter Reduktion der Disulfidbrücke als H<sub>2</sub>S freigesetzt. In einem auf Fogo & Popowsky (1949) zurückgehenden Assay kann dieser Schwefel über die spezifische Bildung eines Farbstoffes quantifiziert werden. Zunächst wird das gasförmige H<sub>2</sub>S, welches im Ansatz gelöst vorliegt, durch die Zugabe von Zinkacetat unter Bildung von Zinksulfid fixiert. Die Zugabe von DMSO führt zur Bildung des Farbstoff-Vorläufers Leucomethylenblau. Erst in Anwesenheit von Fe<sup>3+</sup>-Ionen bildet sich der lösliche Farbstoff Methylenblau. Die Menge des Farbstoffs kann über die Absorption bei 667 nm quantifiziert werden.

Für einen Standardassay wurden 10-50 µg Protein mit 0,5 mM Cystein und 2 mM DTT in einem Gesamtvolumen von 350 µl (100 mM Tris/HCl, pH 9,3) für 1 h bei 37°C und unter Schwenken inkubiert. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 50 µl Zinkacetat-Lösung gestoppt und für 10 min inkubiert. Dann folgte die Zugabe von 50 µl DMPD-Lösung und 50 µl Fe<sup>3+</sup>-Lösung. Die Färbung erfolgte für 1 h bei 22°C. Dann wurde die Absorption bei 667 nm gemessen. Zur Quantifizierung wurden Eichreihen mit Na<sub>2</sub>S erstellt.

Die verwendeten Lösungen setzten sich wie folgt zusammen:

Zinkacetat-Lösung: 5,5% (w/v) Zn-Acetat · 2 H<sub>2</sub>O  
1,5% (w/v) Na-Acetat · 3 H<sub>2</sub>O  
in ddH<sub>2</sub>O

DMPD-Lösung: 0,1% (w/v) N,N-Dimethyl-1,4-Phenylendiamin-Dihydrochlorid  
In 6N HCl

Eisen-Lösung: 10% Ammonium-Eisen(III)-Sulfat Dodekahydrat  
In 0,5 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

#### **4.4.16 AO-Aktivitätsassay im nativen Gel**

Die Aktivität der AO aus Pflanzenextrakten oder in aufgereinigter Form kann mit einem Aktivitätsassay im nativen Gel visualisiert werden. Im Fall der Rohextrakt-Proben wurden zunächst mindestens 50 mg Pflanzenmaterial mit 50 µl Extraktionspuffer (100 mM Kalium-Phosphat-Puffer pH 7,5; 2,5 mM EDTA; 5 mM DTT) versetzt und bei 4°C in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß mit einem Dorn zerquetscht. Für entsprechend größere Ansätze erfolgte der Aufschluss in einem Mörser ebenfalls bei 4°C. Die Zellbestandteile wurden bei 15000 x g für 15 min bei 4°C pelletiert und der Überstand auf seinen Proteingehalt hin untersucht. Für die Analyse im 7,5%igen nativen Gel wurden ca. 50-500 µg Gesamtprotein eingesetzt. Nach der Auftrennung wurde das Gel zunächst für 10 min in 100 mM Kalium-Phosphat-Puffer pH 7,5 äquilibriert. Die Färbung erfolgte dann in 10 ml Färbelösung. Im Falle der AO enthält sie 300 µM Substrat (Indol-3-Carboxaldehyd oder 1-Naphthaldehyd), 100 µM PMS und 400 µM MTT in 100 mM Kalium-Phosphat-Puffer, pH 7,5.

#### **4.4.17 Silbersulfid-Aktivitätsassay im nativen Gel**

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein neuer Gel-basierender Assay entwickelt, um die Aktivität von L-Cystein-Desulfurasen sichtbar zu machen. Die Aktivitäts-Färbung basiert auf folgenden Reaktionsmechanismen: Zunächst wird das Substrat L-Cystein zu L-Alanin und

einem proteingebundenen Persulfid umgesetzt. In Anwesenheit von DTT wird dieser Schwefel als  $\text{H}_2\text{S}$  freigesetzt. Mit diesem Gas reagiert spontan Silbernitrat unter Bildung des bräunlichen und schwerlöslichen Silbersulfids.

Dieser Assay sollte vor allem für die Analyse pflanzlicher Rohextrakte Anwendung finden. Denn um die detektierte Aktivität bestimmten Proteinen zuordnen zu können, war es notwendig, diese zunächst nativ zu separieren. Dazu wurde wie oben beschrieben eine native-PAGE durchgeführt. Es wurden ca. 50  $\mu\text{g}$  des jeweiligen Rohextraktes aufgetragen und auf einem 12%igen Gel für mindestens 3 h bei 70 V aufgetrennt. Das Gel wurde daraufhin kurz in Reaktionspuffer (100 mM Tris, ungepuffert) äquilibriert. Die Färbelösung wurde jedes Mal frisch angesetzt. Sie enthält 10 mM DTT, 10 mM L-Cystein und 10 mM Silbernitrat in 100 mM Tris (ungepuffert). Während der Färbung behält das Protein seine native Konformation bei. Daher kann die Färbung nahezu unbegrenzt fortgesetzt werden. So wird das Gel bei 4°C oder Raumtemperatur für bis zu 48 Stunden in der Färbelösung belassen, bis die gewünschte Bandenintensität erreicht ist. Zum Abstoppen der Reaktion wird die überschüssige Lösung durch Waschen des Gels in  $\text{H}_2\text{O}$  entfernt.

Neben der Visualisierung der L-Cystein-Desulfurase-Aktivität ist dieser Assay auch geeignet, um die L-Selenocystein-Lyase-Aktivität sichtbar zu machen. Hierfür wird eine Färbelösung Lösung mit 10 mM L-Selenocystin anstelle von L-Cystein hergestellt. Das L-Selenocystin wird in Anwesenheit der hohen DTT-Konzentrationen (10 mM) sukzessive zu Selenocystein umgesetzt. Dieses wird von den Enzymen als Substrat akzeptiert und in Anwesenheit von DTT zu L-Alanin und  $\text{H}_2\text{Se}$  umgesetzt. Silbernitrat reagiert mit  $\text{H}_2\text{Se}$  unter Bildung des bräunlich-schwarzen Silberselenids.

#### **4.4.18 Fe/S-Cluster Assemblierung**

Dieser Assay wurde durchgeführt, wie von Dos Santos et al. (2004) beschrieben. Alle Reaktionen fanden anaerob unter Argon-Athmosphäre in 9,2 ml Vials oder in einer Anaerob-Werkbank statt. Dazu wurden zunächst 250 nmol NifU mit 25 nmol Av. NifS bzw. ABA3-NifS in Anwesenheit von 0,5 mM L-Cystein und 2 mM  $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2$  in 25 mM Tris pH 7,4 mit 0,1 M NaCl auf Eis für 1 h inkubiert. Dieser Mix wurde nachfolgend über die Säule aus 1,5 cm unbeladener chelatierender Sepharose (Pharmacia) und 3 cm Q-Sepharose (Amersham Bioscience) gegeben, die zuvor mit 100 mM NaCl in 25 mM Tris, pH 7,4 äquilibriert wurde. Nach einem Waschschrift mit demselben Puffer wurde das Protein mit 400 mM NaCl in 25 mM Tris, pH 7,4 eluiert. Diese Protein-Fraktion enthält das Eisen/Schwefel(Fe/S)-Cluster beladene NifU-Protein. In einem Aktivierungs-Mix werden 4 mM MgATP, 5,6  $\mu\text{M}$  Apo-Fe-



Protein, 5,6  $\mu\text{M}$  beladenens NifU, 5,6  $\mu\text{M}$  ABA3-NifS und 4 mM DTT in 25 mM Tris, pH 7,4 vereinigt. Parallel wird der Reaktions-Mix vorbereitet, indem 300  $\mu\text{l}$  ATP-regenerierendes System mit 200  $\mu\text{l}$  ddH<sub>2</sub>O versetzt werden. Um die Reaktion zu starten, werden 400  $\mu\text{l}$  Aktivierungs-Mix mit dem Reaktions-Mix vermischt und durch die Zugabe von FeMo-Protein gestartet. Die Inkubation erfolgt für 20 min bei 30°C im Wasserbad. Dann wird die Reaktion durch die Zugabe von 250  $\mu\text{l}$  0,25 M EDTA abgestoppt. Mit einem Shimadzu GC-14 Gaschromatographen wurde nun die Produktion von H<sub>2</sub> gemessen.

#### **4.4.19 MPT-Nachweis über FormA-dephospho**

##### **4.4.19.1 Probenvorbereitung**

Die extrem sauerstoffsensitiven Substanzen Moco sowie MPT können nicht direkt detektiert werden. Die Analyse Moco- bzw. MPT-haltiger Proteine macht es daher notwendig, beide Verbindungen zunächst in eine stabilere und gut zu detektierende Form zu überführen. Man nutzt hierbei FormA-dephospho (Johnson *et al.*, 1984), welches das gemeinsame stabile Derivat sowohl von Moco als auch von MPT darstellt. Diese Substanz ist wegen des konjugierten heterozyklischen Ringsystems stark fluoreszent und kann so sensitiv nachgewiesen werden. Die Anregung findet mit 370 nm statt, die Emission wird bei 450 nm gemessen. Eine Unterscheidung zwischen ursprünglich gebundenem Moco und MPT ist mit dieser Methode allerdings nicht möglich.

Für einen standardmäßigen Ansatz nach Johnson und Rajagopalan (1982) und Johnson *et al.* (1984) wurden 5-10 nmol des aufgereinigten Proteins in 400  $\mu\text{l}$  0,1 M Tris/HCl, pH 7,2 mit frisch angesetzter Oxidationslösung (1% I<sub>2</sub>/KI-Lösung (914  $\mu\text{l}$ ), 27% HCl (86  $\mu\text{l}$ )) versetzt und für 30 min bei 95°C oxidiert. Trübungen und Niederschläge wurden bei 11.000 x g für 5 min pelletiert. Der erhaltene Überstand wurde mit 56  $\mu\text{l}$  frischer 1%iger Ascorbinsäure-Lösung vollständig reduziert. Nach Zugabe von 10  $\mu\text{l}$  1 M MgCl<sub>2</sub> erfolgte die Dephosphorylierung in Anwesenheit von 0,5 U Alkalischer Phosphatase für 45 min bei Raumtemperatur im Dunkeln. Bei diesem Schritt erhöht sich die Hydrophobizität des Pterin-Derivats, was während der Anionenaustauscher-Chromatographie zu einer besseren Abtrennung der Verunreinigungen führt. Nach erneuter Zentrifugation für 5 min bei 11.000 x g wurde der Überstand für die weitere Aufreinigung eingesetzt.

#### **4.4.19.2 Isokratische Anionenaustauscher-Chromatographie**

Aus den wie oben beschrieben vorbereiteten Proben wurde mittels einer starken Anionenaustauscher-Matrix (Q-Sepharose<sup>TM</sup> Fast Flow, Amersham) die FormA-dephospho-Verbindung aufgereinigt. Das Matrixmaterial wurde in 1 M NaCl über Nacht gequollen, mit ddH<sub>2</sub>O gewaschen und mit 1 M Ammoniumacetat in die Acetat-Form überführt. Etwa 0,5 ml dieses Materials wurden in leere Nick-Säulchen gefüllt, mit 10 ml ddH<sub>2</sub>O gespült und mit einer Fritte abgeschlossen. Vor jedem Aufreinigungsschritt wurden die Säulchen mit 10 ml 1 M Ammoniumacetat und 10 ml ddH<sub>2</sub>O gespült. Nach dem Laden der Probe wurde erneut mit 10 ml ddH<sub>2</sub>O gewaschen, bevor mit 10 mM Essigsäure eluiert wurde. Dabei wurde zunächst ein Totvolumen von 300 µl verworfen, um anschließend 800 µl Eluat aufzufangen. Dieses Eluat wurde für die HPLC-Analyse eingesetzt.

#### **4.4.19.3 HPLC-Analyse von FormA-dephospho**

Die Eluate der vorangehenden Aufreinigung wurden durch eine HPLC-Chromatographie an einer ODS Hypersil 120 A Säule bei Raumtemperatur final gereinigt und analysiert. Dabei kann die FormA-Menge über die Integration der Peakfläche quantifiziert werden. Verwendet wurde eine HP Series 1100-HPLC (Agilent). Die Elution erfolgte bei einer Flussrate von 1 ml/min. Der Laufpuffer war eine Mischung aus 5mM Ammoniumacetat und 15%igem Methanol (85:15). Der FormA-Peak eluierte nach ca. 5,4 ml, was durch Standards mit MPT-Synthase oder Moco-Carrier-Protein bestätigt wurde. Die Analyse der Daten erfolgte mit der Software ChemStation for LC 3D (Agilent).

#### **4.4.20 Bestimmung des PLP-Gehaltes von Proteinen**

Die Saturierung des Proteins mit PLP wurde über eine 1969 durch Adams entwickelte Methode bestimmt. Dabei macht man sich die fluoreszenten Eigenschaften des spezifischen Reaktionsproduktes von PLP mit Cyanid zunutze. Eine Standard-Probe setzt sich wie folgt zusammen: Etwa 10-100 µg Protein werden mit 5 mM Kalium-Phosphat-Puffer, pH 7,4 auf 200 µl verdünnt, bevor 200 µl 11%ige Trichloressigsäure zugegeben werden. Dieser Mix wird für 15 min bei 50°C denaturiert. Die pH-Wert-Einstellung erfolgt über die Zugabe von 140 µl 3,3 M K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, bevor 50 µl 20 mM KCN dazupipettiert werden. Der Mix wird erneut für

25 min auf 50°C erhitzt. Die Zugabe von 70 µl 28%iger Phosphorsäure und 1 ml 2 M Kalium-Acetat bringt die Lösung auf einen pH von 3,8, in dem das Reaktionsprodukt seine größte Fluoreszenz zeigt. Die Probe wird mit Licht der Wellenlänge 325 nm angeregt. Die Fluoreszenz wird bei 420 nm gemessen. Die Quantifizierung erfolgte anhand eines PLP-Standards.

#### **4.4.21 1,5-I-AEDANS-In-Gel-Assay**

Dieser Assay stellt eine neue Methode zur Visualisierung eines Protein-gebundenen Persulfids dar. 1,5-I-AEDANS zeichnet sich durch ein definiertes Laufverhalten während einer SDS-PAGE aus. Es ist unter UV-Licht als fluoreszierende Bande im Gel deutlich zu erkennen. Grundlage für diesen Assay ist nun, dass die Reaktion des 1,5-I-AEDANS mit anderen Substanzen dieses Laufverhalten zum Teil dramatisch beeinflusst. Die Parameter für diesen Assay wurden so gewählt, dass sich letztlich das Reaktionsprodukt aus Persulfid und 1,5-I-AEDANS von anderen auftretenden Reaktionsprodukten trennen und eindeutig im Gel bestimmen lässt. Die Proteinproben werden dafür zunächst in einen Puffer gebracht, der keine der bekannten Reaktionspartner des 1,5-I-AEDANS enthält. Dazu zählen DTT, TCEP, βMe, Imidazol und Cystein. Als Standardpuffer wurde hier 100 mM Tris, pH 9,3 verwendet. Dann folgte die Inkubation von ca. 20 µg Protein mit 0,5 µl 1 mM 1,5-I-AEDANS, welches in 100 mM Tris, pH 9,3 angesetzt wurde, für 30 min bei 4°C. Überschüssiges 1,5-I-AEDANS wurde durch die Zugabe von 1 µl 1 mM L-Cystein (in 100 mM Tris, pH 9,3) abreagiert. Die Probe wurde durch die Zugabe von SDS-Ladepuffer für 1 min bei Raumtemperatur denaturiert und sofort auf ein 10-15%iges SDS-PA-Gel aufgetragen, welches durch die Zugabe von 140 µl 4 M NaOH zum Gelmix einen leicht erhöhten pH-Wert hatte. Dadurch verbessert sich die Auftrennung der verschiedenen 1,5-I-AEDANS-Reaktionsprodukte. Die Auftrennung erfolgte bei 200 V für 1 h. Zur Visualisierung der Banden wurde das Gel UV-Licht ausgesetzt.

#### **4.4.22 Schwefelübertragung zwischen den ABA3-Domänen**

Die *in vivo*-Situation zeigt, dass die NifS-ähnliche-Domäne von ABA3 zwar alleine für die Mobilisierung des Schwefels aus L-Cystein verantwortlich ist, die Übertragung dieses Schwefels auf die Zielproteine AO/XDH aber nur in Abhängigkeit von der C-terminalen

Domäne erfolgen kann (Sagi *et al.*, 2002; Dai *et al.*, 2005). In dieser Arbeit sollte nun gezeigt werden, dass prinzipiell ein Persulfid von der NifS-ähnlichen-Domäne auf die c-terminale Domäne übertragen werden kann. Ein solches Persulfid kann mittels des 1,5-I-AEDANS-Gel-Assays verfolgt werden.

Beide ABA3-Domänen wurden zunächst für 1 h bei 4°C mit 10 mM DTT vorbehandelt, um evtl. gebundene Persulfide oder andere Cystein-gebundene Gruppen abzuspalten. Danach wurde ein Pufferwechsel vorgenommen, um überschüssiges DTT zu entfernen. ABA3-NifS wurde dabei in 20 mM Tris/HCl pH 9,3, ABA3-CT in 20 mM Tris/HCL pH 7,0 mit Hilfe einer Nick-Säule umgepuffert.

Die NifS-ähnliche-Domäne wurde daraufhin mit 0,5 mM Cystein für 1 h bei 4°C inkubiert und so vollständig mit Persulfid beladen. Über einen erneuten Umpufferungsschritt, diesmal in 20 mM Tris/HCl pH 7,0, wurde der Überschuss an Cystein entfernt. Die beiden Domänen wurden nun für 1 h bei 4°C co-inkubiert, bevor sie über einen Gelfiltrationslauf mit einer Superdex 200 10/30 analytical grade wieder separiert wurden. Mit den Proben wurde weiterhin so verfahren, wie unter 4.4.21 beschrieben.

## 5. Zusammenfassung

L-Cystein-Desulfurasen machen Schwefel in Form eines Persulfids für eine Vielzahl an Stoffwechselprozessen im Organismus verfügbar. Die cytosolische Molybdän-Cofaktor (Moco)-Sulfurase ABA3 aus *A. thaliana* mobilisiert Schwefel und überträgt ihn auf den Moco der Zielproteine Aldehydoxidase und Xanthindehydrogenase. ABA3 gliedert sich in eine NH<sub>2</sub>-terminale Domäne (ABA3-NifS) mit signifikanten Homologien zu NifS-Proteinen und eine C-terminale Domäne (ABA3-CT), die mit hoher Effizienz in der Lage ist, Moco zu binden. Erst beide Domänen im Zusammenspiel können *in vivo* Schwefel auf den Moco übertragen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde ABA3-NifS einer eingehenden biochemischen Charakterisierung unterzogen.

Separat exprimiertes ABA3-NifS weist eine L-Cystein-Desulfurase-Aktivität sowie eine L-Selenocystein-Lyase-Aktivität auf. Die  $K_m$ -Werte für L-Cystein bzw. L-Selenocystein liegen bei 35  $\mu$ M bzw. 200  $\mu$ M, die entsprechenden spezifischen Aktivitäten bei 3,7 bzw. 21,4 mol Produkt  $\cdot$  min<sup>-1</sup>  $\cdot$  mol<sup>-1</sup> Protein. Für die Moco-Sulfurase HMCS aus *H. sapiens* konnten vergleichbare Werte erhalten werden. ABA3-NifS bindet unter Beteiligung des unter NifS-Proteinen konservierten Lys271 ein Pyridoxalphosphat (PLP) als den für die Aktivität essentiellen Cofaktor. Nach rekombinanter Expression in *E. coli* ist ABA3-NifS zu 60%, die Lys271Ser-Variante zu 3,8% mit PLP saturiert. Der PLP-Gehalt von ABA3-NifS wird durch Zugabe von Pyridoxin zum Expressionsmedium auf über 90% erhöht, was ein stöchiometrisches Bindungsverhältnis von 1:1 anzeigt. ABA3-NifS bindet aus L-Cystein mobilisierten Schwefel in Form eines Persulfids über das konservierte Cys430. Das Persulfid kann *in vitro* in Anwesenheit von NifU aus *A. vinelandii* und Fe<sup>2+</sup>-Ionen zur Assemblierung von Fe/S-Clustern eingesetzt werden. Die Cys430Ala-Variante hat 18% L-Cystein-Desulfurase-Restaktivität und ist, im Gegensatz zu anderen NifS-Proteinen, auch in der L-Selenocystein-Lyase-Aktivität beeinträchtigt. Die ABA3-NifS-Varianten Cys428/430Ala und Cys430/435Ala weisen für L-Cystein eine Restaktivität von 30% bzw. 32% auf, woraufhin auf eine Loop-Struktur mit Disulfidbrücke im aktiven Zentrum geschlossen wird. Die aus der *A. thaliana*-Mutante *aba3-1* hervorgehende Variante Gly469Glu zeigt 11,5% L-Cystein-Desulfurase-Restaktivität, was vermutlich auf strukturelle Effekte zurückzuführen ist. Die auf Basis eines Xanthinurie TypII-Patienten erzeugte Tyr301Ile-Variante besitzt, offenbar aufgrund von beeinträchtigter PLP-Koordinierung, lediglich 4,4% Restaktivität. ABA3-NifS zeigt schwache Wechselwirkungen mit ABA3-CT und hat auf diesen einen stabilisierenden Effekt. Der Schwefel wird von ABA3-NifS auf ABA3-CT als Persulfid übertragen. Ein neu entwickelter Silbersulfid-Aktivitätsassay ermöglicht die Visualisierung einer spezifischen L-Cystein-Desulfurase-Aktivität in Rohextrakten. So wurde durch die Identifizierung des nativen ABA3 in *A. thaliana* gezeigt, dass neben den NifS-Proteinen aus Mitochondrien und Plastiden ABA3 eine echte cytosolische L-Cystein-Desulfurase mit hochspezifischer Funktion darstellt.

## 6. Literaturverzeichnis

**Adams E.** (1969): Fluorometric determination of pyridoxal phosphate in enzymes.

*Anal Biochem.* **31**:118-22.

**Alikulov, Z.A.** & Mendel, R.R. (1984): Molybdenum cofactor from tobacco cell cultures and milk xanthine oxidase: Involvement of sulfhydryl groups in dimerization activity of cofactor. *Biochem. Physiol. Pflanzen* **179**, 693-705.

**Amrani, L.**, Primus, J., Glatigny, A., Arcangeli, L., Scazzocchio, C. and Finnerty, V. (2000): Comparison of the sequences of the *Aspergillus nidulans* *hxB* and *Drosophila melanogaster* *ma-I* genes with *nifS* from *Azotobacter vinelandii* suggests a mechanism for the insertion of the terminal sulphur atom in the molybdopterin cofactor. *Mol. Microbiol.* **38** (1), 114-125.

**Balk, J.**, & Lobreaux, S., (2005): Biogenesis of iron-sulfur proteins in plants *TRENDS in Plant Science* **10**

**Bartels, H.** (1930): Molybdän als Katalysator der biologischen Stickstoffbindung. *Arch. Mikrobiol.* **1**: 333-342.

**Beedham C.** (1985): Molybdenum hydroxylases as drug-metabolizing enzymes. *Drug Metab Rev.* **16**:119-56.

**Begley TP**, Xi J, Kinsland C, Taylor S, McLafferty F. (1999): The enzymology of sulfur activation during thiamin and biotin biosynthesis. *Curr Opin Chem Biol.* **3**:623-9.

**Behshad E**, Parkin SE, Bollinger JM Jr. (2004): Mechanism of cysteine desulfurase Slr0387 from *Synechocystis* sp. PCC 6803: kinetic analysis of cleavage of the persulfide intermediate by chemical reductants. *Biochemistry.* **43**:12220-6

**Beinert H.** (2000): A tribute to sulfur. *Eur J Biochem.* **267**:5657-64

**Beinert H.** (2000): Iron-sulfur proteins: ancient structures, still full of surprises. *J Biol Inorg Chem.* **5**:2-15

**Bittner F**, Oreb M, Mendel R R. (2001) ABA3 is a molybdenum cofactor sulfurase required for activation of aldehyde oxidase and xanthine dehydrogenase in *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem.* **276**, 40381-40384.

**Bogart, A.M.** & Bernini, C.F. (1981): The molybdoenzyme system of *Drosophila melanogaster*. I. Sulfite oxidase: Identification and properties. Expression of the enzyme in *maroonlike*, (*ma-I*), *low-xanthine dehydrogenase* (*lxd*) and *cinnamon* (*cin*) flies. *Biochem. Genet.* **19**, 929.

**Bordas, J.**, Bray. R.C., Garner, C.D., Gutteridge, S. and Hasnain, S.S. (1980): X-ray absorption spectroscopy of xanthine oxidase. The molybdenum centres of the functional and the desulpho forms. *Biochem. J.* **191**, 499-508.

**Boyington, J.C.**, Gladyshev, V.N., Khangulov, S.V., Stadtman, T.C. and Sun, P.D. (1997): Crystal structure of formate dehydrogenase H: Cataysis involving Mo, molybdopterin,

selenocysteine and an Fe<sub>4</sub>S<sub>4</sub> cluster. *Science* **275**, 1305-1308.

**Bradford, M.M.** (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgramme quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.

**Chandler, P.M.** & Robertson, M. (1994): Gene expression regulated by abscisic acid and its relation to stress tolerance. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **45**, 113-141.

**Chovnick, A.**, Finnerty, V., Schalet, A. and Duck, P. (1969): Studies on genetic organization in higher organisms: I. Analysis of a complex gene in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **62**, 145-169.

**Cicchillo RM**, Iwig DF, Jones AD, Nesbitt NM, Baleanu-Gogonea C, Souder MG, Tu L, Booker SJ. (2004): Lipoyl synthase requires two equivalents of S-adenosyl-L-methionine to synthesize one equivalent of lipoic acid. *Biochemistry*. **43**:6378-86

**Cicchillo RM**, Booker SJ. (2005): Mechanistic investigations of lipoic acid biosynthesis in *Escherichia coli*: both sulfur atoms in lipoic acid are contributed by the same lipoyl synthase polypeptide. *J Am Chem Soc.* **127**:2860-1

**Cohen, H.J.**, Fridovich, I., Rajagopalan, K.V. (1971): Hepatic sulfite oxidase. A functional role for molybdenum. *J. Biol. Chem.* **246**, 374-382.

**Cone, J. E.**, Martin del Rio, R., Davis, J. N., and Stadtman, T. C. (1976) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **73**,2659-2663

**Coughlan, M.P.** (1980): Molybdenum and molybdenum containing enzymes. Pergamon Press. Oxford.

**Courtright, J.B.** (1967): Polygenic control of aldehyde oxidase in *Drosophila*. *Genetics* **57**, 2539.

**Cove, D.J.** & Pateman, J.A. (1963): Independently segregating genetic loci concerned with nitrate reductase activity in *Aspergillus nidulans*. *Nature* **198**, 262-263.

**Cupp-Vickery, J. R.**, Urbina, H., Vickery, Larry E. (2003) Crystal Structure of IscS, a Cysteine Desulfurase from *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* **330**, 1049–1059

**Dai X**, Hayashi K, Nozaki H, Cheng Y, Zhao Y. (2005): Genetic and chemical analyses of the action mechanisms of sirtinol in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **102**:3129-34.

**Dos Santos, P. C.**, Smith, Archer D., Frazzon, Jeverson, Cash ,Valerie L., Johnson, Michael K., Dean, Dennis R. (2004): Iron-Sulfur Cluster Assembly. *J. Mol. Biol.* **279**, 19705–19711, 2004

**Esaki, N.**, Nakamura, T., Tanaka, H., Soda, K. (1982): Selenocysteine Lyase, a Novel Enzyme That Specifically Acts on Selenocysteine *J. Biol. Chem.* **257**, 4386-4391

**Fogo, J. K.**, & Popowsky, M., (1949): Spectrophotometric determination of hydrogen sulfide - methylene blue method. *Anal. Chem.* **21**, 732.

**Forchhammer K**, Bock A (1991): Selenocysteine synthase from *Escherichia coli*.

Analysis of the reaction sequence. *J Biol Chem.* **266**:6324-8

**Forrest, H.S.**, Glassman, E. and Mitchell, H.K. (1956): Conversion of 2-amino-4-hydroxypteridine to isoxanthopterin in *Drosophila melanogaster*. *Science* **124**, 725-726.

**Forrest, H.S.**, Hanley, E.W. and Lagowski, J.M. (1961): Biochemical differences between the mutants *rosy-2* and *maroon-like* of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **46**, 1455-1463.

**Forstrom JW**, Zakowski JJ, Tappel AL. (1978): Identification of the catalytic site of rat liver glutathione peroxidase as selenocysteine. *Biochemistry.* **17**:2639-44.

**Gilmour, S.J.** & Thomashow, M.F. (1991): Coldacclimation and cold-regulated gene expression in ABA-mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol. Biol.* **17**, 1233-1240.

**Fu, L-H.**, Wang X-F., Eyal Y., She Y-M., Donald LJ., Standing KG., BenHayyim G. (2002): A selenoprotein in the plant kingdom: mass spectrometry confirms that an opal codon (UGA) encodes selenocysteine in *Chlamydomonas reinhardtii* glutathione peroxidase. *J. Biol. Chem.* **277**: 25983–25991

**Glassman E**, Mitchell HK. (1959): Mutants of *Drosophila Melanogaster* Deficient in Xanthine Dehydrogenase. *Genetics.* **44**:153-62

**Glassman, E.** & Pinkerton, W. (1960): Complementation at the *maroon-like* eye-color locus of *Drosophila melanogaster*. *Science* **131**, 1810-1811.

**Gupta, U.C.** (ed) (1997): Molybdenum in Agriculture. Cambridge University Press.

**Hänzelmann P**, Schindelin H (2004): Crystal structure of the S-adenosylmethionine-dependent enzyme MoaA and its implications for molybdenum cofactor deficiency in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **101**:12870-5.

**Hartley, M.J.** (1970): Contrasting complementation patterns in *Aspergillus nidulans*. *Genet. Res.* **16**, 123-125.

**Havemeyer A**, Bittner F, Wollers S, Mendel R, Kunze T, Clement B. (2006): Identification of the missing component in the mitochondrial benzamidoxime prodrug-converting system as a novel molybdenum enzyme. *J Biol Chem.* **281**:34796-802.

**Heino, P.**, Sandman, G., Lång, V., Nordin, K. and Palva, E.T. (1990): Absciscic acid deficiency prevents development of freezing tolerance in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Theor. Appl. Genet.* **79**, 801-806.

**Hesberg C**, Hansch R, Mendel RR, Bittner F (2004): Tandem orientation of duplicated xanthine dehydrogenase genes from *Arabidopsis thaliana*: differential gene expression and enzyme activities. *J Biol Chem.* **279**:13547-54.

**Hille, R.** (1996a): Structure and function of mononuclear molybdenum enzymes. *J. Biol. Inorg. Chem.* **1**, 397-404.

**Hille, R.** (1996b): The mononuclear molybdenum enzymes. *Chem. Rev.* **96**, 2757-2816.



- Hinton, S.G.** & Dean D. (1990): Biogenesis of Molybdenum cofactors. CRC rev. *Microbiol.*, **17**: 169-188
- Hoff, T.**, Schnorr, K.M., Meyer, C. and Caboche, M. (1995): Isolation of two *Arabidopsis* cDNAs involved in early steps of molybdenum cofactor biosynthesis by functional complementation of *Escherichia coli* mutants. *J. Biol. Chem.* **270**, 61006107.
- Ichida, K.**, Matsumura, T., Sakuma, R., Hosoya, T. & Nishino, T. (2001): Mutation of human molybdenum cofactor sulfurase gene is responsible for classical xanthinuria type II. *Biochem Biophys Res Commun* **282**, 1194-1200.
- Jarrett JT.** (2005): Biotin synthase: enzyme or reactant? *Chem Biol.* **12**:409-10
- Johnson, J.L.**, Hainline, B.E. and Rajagopalan, K.V. (1980): Characterization of the molybdenum cofactor of sulfite oxidase, xanthine oxidase and nitrate reductase. Identification of a pterin as structural component. *J. Biol. Chem.* **255**, 17831786.
- Johnson J.L.** & Rajagopalan K.V. (1982): Structural and metabolic relationship between the molybdenum cofactor and urothione. *Proc Natl Acad Sci USA*, **79**: 68566860.
- Johnson, J.L.**, Hainline, B.E., Rajagopalan, K.V., & Arison, B.H. (1984): The pterin component of the molybdenum cofactor. Structural characterization of two fluorescent derivatives. *J Biol Chem* **259**: 5414-5422
- Johnson, J.L.**, Bastian, N.R., Rajagopalan, K.V. (1990): Molybdopterin guanine dinucleotide: A modified form of molybdopterin identified in the molybdenum cofactor of dimethyl sulfoxide reductase from *Rhodobacter phaeoides* forma specialis denitrificans. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**: 3190-3194.
- Jones JB**, Dilworth GL, Stadtman TC (1979): Occurrence of selenocysteine in the selenium-dependent formate dehydrogenase of *Methanococcus vannielii*. *Arch Biochem Biophys.* **195**:255-60
- Joshi, M.S.**, Johnson, J.L., Rajagopalan, K.V. (1996): Molybdenum cofactor biosynthesis in *Escherichia coli* *mod* and *mog* mutants. *J Bacteriol.*; **178**(14): 4310-2.
- Kaiser, J.T.**, Clausen, T., Bourenkow, G.P., Bartunik, H-D., Steinbacher, S., Huber, R. (2000): Crystal Structure of a NifS-like Protein from *Thermotoga maritima*: Implication for Iron Sulfur Cluster Assembly. *J. Mol. Biol.* **297**, 451-464
- Kessler, D.** (2006): Enzymatic activation of sulfur for incorporation into biomolecules in prokaryotes *FEMS Microbiol. Rev.* **30**, 825–840
- Kisker C.**, Schindelin H., Pacheco A., Wehbi W.A., Garret R.M., Rajagopalan K.V., Enemark J.H., and Rees D.C. (1997): Molecular basis of sulfite oxidase deficiency from structure of sulfite oxidase. *Cell* **91**: 973-983.
- Kitamura, S.**, Ohashi, K.N.K., Sugihara, K., Hosokawa, R. Akagawa, Y. and Ohta, S. (2001): Extremely high drug-reductase activity

based on aldehyde oxidase in monkey liver. *Biol. Pharm. Bull.* **24**, 856-859.

**Komoto N**, Sezutsu H, Yukuhiro K, Banno Y, Fujii H (2003): Mutations of the silkworm molybdenum cofactor sulfurase gene, *og*, cause translucent larval skin. *Insect Biochem Mol Biol.* **33**:417-27

**Koshiba, T.**, Saito, E., Ono, N., Yamamoto, N., Sato, M. (1996): Purification and Properties of Flavin- and Molybdenum-Containing Aldehyde Oxidase from Coleoptiles of Maize. *Plant Physiol.* **110**, 781-789

**Kramer, S.P.**, Johnson, J.L., Ribeiro, A., Millington, D.S. and Rajagopalan, K.V. (1987): The structure of the molybdenum cofactor. Characterization of di(carboxamidomethyl)-molybdopterin from sulfite oxidase and xanthine oxidase. *J. Biol. Chem.* **262**, 16357-16363.

**Kuper, J.**, Llamas, A., Hecht, H. J., Mendel, R. R., and Schwarz, G. (2004) Structure of the molybdopterin-bound Cnx1G domain links molybdenum and copper metabolism. *Nature* **430**, 806–806

**Lacourciere GM**, Stadtman TC (1998): The NIFS protein can function as a selenide delivery protein in the biosynthesis of selenophosphate. *J Biol Chem.* **273**:30921-6.

**Lauhon, C.T.**, & Kambampati, R. (2000) The *iscS* gene in *Escherichia coli* is required for the biosynthesis of 4-thiouridine, thiamin, and NAD. *J Biol Chem* **275**, 20096-103.

**Lauhon CT.** (2002): Requirement for *IscS* in biosynthesis of all thionucleosides in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* **184**:6820-9.

**Leimkühler S.** & Rajagopalan K.V. (2001): A sulfurtransferase is required in the transfer of cysteine sulfur in the in vitro synthesis of molybdopterin from precursor Z in *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, **276**: 22024-22031.

**Léon-Kloosterziel, K.M.**, Alvarez Gil, M., Ruijs, G.J., Jacobsen, S.E., Olszewski, N.E., Schwartz, S.H., Zeevaart, J.A.D and Koorneef, M. (1996): Isolation and characterization of abscisic aciddeficient *Arabidopsis* mutants at two new loci. *The Plant Journal* **10** (4), 655-661.

**Lewis, N.J.**, Hurt, P., Sealy-Lewis, H.M. and Scazzocchio, C. (1978): The genetic control of the molybdoflavoproteins in *Aspergillus nidulans*. A comparison between purine hydroxylase I and II. *Eur. J. Biochem.* **91**, 311-316.

**Leydecker, M.-T.**, Moureaux, T., Kraepiel, Y., Schnorr, K. and Caboche, M. (1995): Molybdenum cofactor mutants, specifically impaired in xanthine dehydrogenase activity and abscisic acid biosynthesis, simultaneously overexpress nitrate reductase. *Plant Physiol.* **107**, 1427-1431.

**Lill, R.**, & Mühlenhoff U., (2006): Iron-Sulfur Protein Biogenesis in Eukaryotes: Components and Mechanisms. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **22**:457–86

**Llamas, A.**, Mendel, R.R., Schwarz, G. (2004): Synthesis of adenylated Molybdopterin An

essential step for molybdenum insertion *J Biol Chem.* **279**(53):55241-6.

**Loiseau, L.**, Ollagnier-de-Choudes S., Nachin, L., Fontecave, M., Barras, F., (2003): Biogenesis of Fe-S Cluster by the Bacterial Suf System *L. Biol. Chem.* **278**, 38352–38359,

**Lotierzo M**, Tse Sum Bui B, Florentin D, Escalettes F, Marquet A (2005): Biotin synthase mechanism: an overview. *Biochem Soc Trans.* **33**:820-3

**Mahler, H.R.**, Mackler, B. and Green, D.E. (1954): Studies on metallo-flavoproteins. III. Aldehyd oxidase: a molybdoflavoprotein. *J. Biol Chem* **210**: 465-480.

**Marin, E.** & Marion-Poll, A. (1997): Tomato *flacca* mutant is impaired in ABA aldehyde oxidase and xanthine dehydrogenase activities. *Plant Physiol. Biochem.* **35** (5), 369-372.

**Massey, V.** & Edmondson, D. (1970): On the Mechanism of Inactivation of Xanthine Oxidase by Cyanide. *J. Biol. Chem.* **245**, 6595-6598

**Matthies A**, Rajagopalan KV, Mendel RR, Leimkuhler S (2004): Evidence for the physiological role of a rhodanese-like protein for the biosynthesis of the molybdenum cofactor in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **101**:5946-51.

**Matthies A**, Nimtz M, Leimkuhler S (2005): Molybdenum cofactor biosynthesis in humans: identification of a persulfide group in the rhodanese-like domain of MOCS3 by mass spectrometry. *Biochemistry.* **44**:7912-20

**Mendel, R.R.** (1992): The plant molybdenum cofactor (MoCo) - its biochemical and molecular genetics. *Plant Mol. Biol.* **1**, 11-16.

**Mendel R. R.**, und Bittner, F. (2006): Cell biology of molybdenum. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1763**:621-35

**Mihara, H.**, Kurihara, T., Yoshimura, T., Soda, K., Esaki, N. (1997): Cysteine Sulfinate Desulfinase, a NIFS-like Protein of *Escherichia coli* with Selenocysteine Lyase and Cysteine Desulfurase Activities. *J. Biol. Chem.* **272**, 22417–22424

**Mihara, H.**, Maeda, M., Fujii, T., Kurihara, T., Hata, Y., Esaki, N. (1999): A *nifS*-like Gene, *csdB*, Encodes an *Escherichia coli* Counterpart of Mammalian Selenocysteine Lyase. *J. Biol. Chem.* **274**, 14768–14772

**Mihara, H.**, Kurihara, T., Yoshimura, T., Esaki, N. (2000): Kinetic and Mutational Studies of Three NifS Homologs from *Escherichia coli*: Mechanistic Difference between L-Cysteine Desulfurase and L-Selenocysteine Lyase Reactions. *J. Biochem.* **127**, 559-567

**Mihara, H.**, Kurihara, T., Watanabe, T., Yoshimura, T., Esaki, N. (2000): cDNA Cloning, Purification, and Characterization of Mouse Liver Selenocysteine Lyase. *J. Biol. Chem.* **275**, 6195–6200,

**Mihara, H.** & Esaki, N. (2002): Bacterial cysteine desulfurases: their function and mechanisms. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **60**:12–23

**Miller JR**, Busby RW, Jordan SW, Cheek J, Henshaw TF, Ashley GW, Broderick JB,

Cronan JE Jr, Marletta MA. (2000): *Escherichia coli* LipA is a lipoyl synthase: in vitro biosynthesis of lipoylated pyruvate dehydrogenase complex from octanoyl-acyl carrier protein. *Biochemistry*. **39**:15166-78.

**Nason A.**, Lee K.Y., Pan S.S., Ketchum P.A., Lamberti A., DeVries J. (1971): *In vitro* formation of assimilatory reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate: nitrate reductase from a *Neurospora* mutant and a component of molybdenum-enzyme. *Proc Natl Acad Sci USA* **68**: 3232-3236.

**Nicholas, D.J.D.** & Nason, A. (1954): Molybdenum and nitrate reductase. II. Molybdenum as a constituent of nitrate reductase. *J. Biol. Chem.* **207**: 353-361.

**Ollagnier-De Choudens S**, Sanakis Y, Hewitson KS, Roach P, Baldwin JE, Munck E, Fontecave M (2000): Iron-sulfur center of biotin synthase and lipoate synthase. *Biochemistry*. **39**:4165-73

**Ollagnier-de-Choudens S**, Lascoux D, Loiseau L, Barras F, Forest E, Fontecave M. (2003): Mechanistic studies of the SufS-SufE cysteine desulfurase: evidence for sulfur transfer from SufS to SufE. *FEBS Lett.* **555**:263-7

**Outten, F.W.**, Wood, M. J., Munoz, F. M., Storz, G. (2003): The SufE Protein and the SufBCD Complex Enhance SufS Cysteine Desulfurase Activity as Part of a Sulfur Transfer Pathway for Fe-S Cluster Assembly in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **278**, 45713–45719

**Palmer T.**, Vasishta A., Whitty W., Boxer D. (1994): Isolation of Protein FA, a product of the *mob* locus required for molybdenum cofactor biosynthesis in *Escherichia coli*. *Eur. J. Biochem.* **222**: 678-692.

**Palmer T.**, Santini C.L., Iobbi-Nivol C., Eaves D.J., Boxer D.H., Giordano G. (1996): Involvement of the *narJ* and *mob* gene products in distinct steps in the biosynthesis of the molybdoenzyme nitrate reductase in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol.*; **20**(4): 875-84.

**Parry, A.D.**, Blonstein, A.D., Babiano, M.J., King, P.J. and Horgan, R. (1991): Absciscic acid metabolism in a wilt mutant of *Nicotiana glauca*. *Plumbaginifolia*. **183**, 237-243.

**Pateman J.A.**, Cove D.J., Rever B.M., Roberts D.B. (1964) A common cofactor for nitrate reductase and xanthine dehydrogenase which also regulates the synthesis of nitrate reductase. *Nature* **201**, 58-60.

**Pienkos, P.T.**, Shah, V.K., Brill, W. (1977): Molybdenum cofactors from molybdoenzymes and in vitro reconstitution of nitrogenase and nitrate reductase. *Proc Natl Acad Sci USA* **74**: 5468-5471.

**Pilon-Smits, E.A.H.**, Garifullina, G.F., Abdel-Ghany, S., Kato, S-I., Mihara, H., Hale, K.L., Burkhead, J.L., Esaki, N., Kurihara, T., and Pilon, M. (2002) Characterization of a NifS-Like Chloroplast Protein from *Arabidopsis*. Implications for Its Role in Sulfur and Selenium Metabolism. *Plant Physiology*, **130**, 1309–1318,

**Pilon, M.**, Owen, J.D., Garifullina, G.F., Kurihara, T., Mihara, H., Esaki, N., and Pilon-

Smits, E.A.H. (2003): Enhanced Selenium Tolerance and Accumulation in Transgenic *Arabidopsis* Expressing a Mouse Selenocysteine Lyase. *Plant Physiology*, **131**, 1250–1257

**Pitterle, D.M.** & Rajagopalan, K.V. (1993). The biosynthesis of molybdopterin in *Escherichia coli*. Purification and characterization of the converting factor. *J. Biol. Chem.* **268**, pp. 13499-13505.

**Pitterle D.M.**, Johnson J.L., Rajagopalan K.V. (1993): *In vitro* synthesis of molybdopterin from precursor Z using purified converting factor. *J Biol Chem.* **262**, 13506-13509.

**Rajagopalan, K.V.** & Johnson, J.L. (1992): The pterin molybdenum cofactors. *J. Biol. Chem.* **267**, 10199-10202.

**Rajagopalan, K.V.** (1996): Biosynthesis of the molybdenum cofactor. In: *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. Neidhardt. F. C., Ed., ASM Press, 674-679. Washington, DC.

**Reichert, D.A.** & Westerfeld, W.W. (1953): Isolation and identification of the xanthine oxidase factor as molybdenum. *J. Biol. Chem.* **203**, 915923.

**Reiss, J.** (2000). Genetics of molybdenum cofactor deficiency. *Hum Genet* **106**, 157-163.

**Reiter, S.**, Simmonds, H.A., Zollner, N., Braun, S.L. and Knedel, M. (1990): Demonstration of a combined deficiency of xanthine oxidase and aldehyde oxidase in xanthinuric patients not forming oxypurinol. *Clin. Chim. Acta.* **187**, 221234.

**Rivers, S.L.**, McNairn, E., Blasco, E., Giordano, G. and Boxer, D.H. (1993): Molecular genetic analysis of the *moa* operon of *E. coli* K-12 required for molybdenum cofactor biosynthesis. *Mol. Microbiol.* **8**, 1071-1081.

**Romao M.J.**, Archer M., Moura I., Moura J.J., LeGall J., Engh R., Schneider M., Hof P., Huber R. (1995) Crystal structure of the xanthine oxidase-related aldehyde oxidoreductase from *D. gigas*. *Science* **270**: 1170-1176.

**Rudolph, M.J.**, Wuebbens, M.M., Rajagopalan, K.V. and Schindelin, H. (2001): Crystal structure of molybdopterin synthase and its evolutionary relationship to ubiquitin activation. *Nature Struct. Biol.* **8**, 42-46.

**Sagi, M.**, Scazzocchio, C., Fluhr, R. (2002): The absence of molybdenum cofactor sulfuration is the primary cause of the *flacca* phenotype in tomato plants. *The Plant Journal* **31**, 305-317

**Sambrook, J.**, Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989): Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press.

**Santamaria-Araujo, J.A.**, Fischer, B., Otte, T., Nimtz, M., Mendel, R.R., Wray, V., and Schwarz, G. (2004): The tetrahydro-pyranopterin structure of the sulfur-free and metal-free molybdenum cofactor precursor. *J. Biol. Chem.* **279**, 15994–15999

**Scazzocchio, C.** (1973): The genetic control of molybdoflavoproteins in *Aspergillus nidulans*. II. Use of NADH dehydrogenase activity

associated with xanthine dehydrogenase to investigate substrate and product inductions. *Mol. Gen. Genet.* **125**, 147-155.

**Scazzocchio, C.**, Holl, F.B. and Fogelman, A.I. (1973): The genetic control of molybdoflavoproteins in *Aspergillus nidulans*. Allopurinol resistant mutants constitutive for xanthine dehydrogenase. *Eur. J. Biochem.* **36**, 428-445.

**Schindelin, H.**, Kisker C., Hilton J., Rajagopalan K.V., Rees D.C. (1996): The overall fold of *Rhodobacter sphaeroides* DMSO reductase is similar to that of FDH. *Science* **272**: 1615-1619.

**Schwartz, S.H.**, Léon-Kloosterziel, K.M., Koorneef, M. and Zeevaart, J.A.D. (1997): Biochemical characterization of the *aba2* and *aba3* mutants in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* **114**, 161-166.

**Schwarz G**, Schulze J, Bittner F, Eilers T, Kuper J, Bollmann G, Nerlich A, Brinkmann H, Mendel R.R. (2000): The molybdenum cofactor biosynthetic protein Cnx1 complements molybdate-repairable mutants, transfers molybdenum to the metal binding pterin, and is associated with the cytoskeleton. *Plant Cell.* **12**:2455-2472

**Schwarz G** (2005): Molybdenum cofactor biosynthesis and deficiency *Cell Mol Life Sci.* **62**:2792-810

**Schwarz, G.** & Mendel, R. R. (2006) Molybdenum Cofactor Biosynthesis and Molybdenum Enzymes. *Annu. Rev. Plant Biol.* **57**:623–47

**Schwinck, I.** & Chovnick, A. (1960): Eye disc transplantations with garnet pseudoalleles. *Drosophila Information Service* **34**, 105-106.

**Seo, M.**, Peeters, A.J., Koiwai, H., Oritani, T., Marion-Poll, A., Zeevaart, J.A.D., Koorneef, M., Kamiya, Y. and Koshiba, T. (2000a): The Arabidopsis aldehyde oxidase 3 (AAO3) gene product catalyzes the final step in abscisic acid biosynthesis in leaves. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 12908-12913.

**Seo, M.** & Koshiba, T. (2002): The complex regulation of ABA biosynthesis in plants. *Trends in Plant Science* **7** (1), 41-48.

**Shah, V.K.** & Brill, W.J. (1977): Isolation of an iron-molybdenum cofactor from nitrogenase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 3249-3253.

**Smith, A.D.**, Frazzon, J., Dean, D.R., Johnson, M. K. (2005): Role of conserved cysteines in mediating sulfur transfer from IscS to IscU. *FEBS Letters* **579** 5236–5240

**Stallmeyer, B.**, Nerlich, A., Schiemann, J., Brinkmann, H. and Mendel, R.R. (1995): Molybdenum co-factor biosynthesis: the Arabidopsis thaliana cDNA *cnx1* encodes a multifunctional two-domain protein homologous to a mammalian neuroprotein, the insect protein Cinnamon and three *Escherichia coli* proteins. *The Plant Journal* **8** (5): 751-762.

**Stallmeyer, B.**, Drugeon, G., Reiss, J., Haenni, A.L. & Mendel, R.R. (1999a). Human molybdopterin synthase gene: identification of a bicistronic transcript with overlapping reading frames. *Am. J. Hum. Genet.* **64**, 698-705.

- Stone, T.W.** & Sommonds, H.A. (1991): Purines: Basic and clinical aspects. Kluwer, London.
- Taylor, I.B.** (1991): Genetics of ABA synthesis. In Davies, W.J. and Jones, H.G. (eds). Absciscic acid, physiology and biochemistry. Bios Publishers. Oxford: 23-37 **184**, 92-96.
- Tirpati, B.**, Vey, J. L., Drennan, C. L., Bollinger, J. M., (2004): Kinetic and Structural Characterization of Slr0077/SufS, the Essential Cysteine Desulfurase from *Synechocystis* sp. *Biochemistry* **43**, 12210-12219
- Tomita, S.**, Ichikawa, T. and Ichikawa, Y. (1993): Retinal oxidase is identical to aldehyde oxidase. *FEBS Lett.* **336**, 272-274.
- Vartanian, N.**, Marcotte, L. and Giraudat, J. (1994): Drought rhizogenesis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* **104**, 761-767.
- Wahl, R.C.**, Warner, C.K., Finnerty, V. and Rajagopalan, K.V. (1982): *Drosophila melanogaster* *ma-l* mutants are defective in the sulfuration of desulfo Mo hydroxylases. *J. Biol. Chem.* **257** (7), 3958-3962.
- Walker-Simmons, M.**, Kudrna, D.A. and Warner, R.L. (1989): Reduced accumulation of ABA during water stress in a molybdenum cofactor mutant of barley. *Plant Physiol.* **90**, 728-733.
- Watanabe, T.**, Ihara, N., Itoh, T., Fujita, T., Sugimoto Y. (2000): Deletion Mutation in *Drosophila* *ma-l* Homologous, Putative Molybdopterin Cofactor Sulfurase Gene Is Associated with Bovine Xanthinuria Type II. *J. Biol. Chem.* **275**, 21789–21792
- Wuebbens, M.M.** & Rajagopalan, K.V. (1995): Investigation of the early steps of molybdenum biosynthesis in *Escherichia coli* through the use of in vivo labeling studies. *J. Biol. Chem.* **270**, 10821087.
- Xiong, L.**, Ishitani, M., Lee, H., Zhu, J-K., (2001): The *Arabidopsis* *LOS5/ABA3* Locus Encodes a Molybdenum Cofactor Sulfurase and Modulates Cold Stress– and Osmotic Stress–Responsive Gene Expression. *The Plant Cell*, **13**, 2063–2083
- Ye, H.**, Abdel-Ghany, S.E., Anderson, T.D., Pilon-Smits, E.A.H., Pilon, M., (2006) *CpSufE* Activates the Cysteine Desulfurase *CpNifS* for Chloroplastic Fe-S Cluster Formation *J. Biol. Chem.* **281**, 8958–8969,
- Zheng, L.**, White, R.H., Cash, V.L., Jack, R.F., Dean, D.R. (1993): Cysteine desulfurase activity indicates a role for NIFS in metallocluster biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* Vol. **90**, 2754-2758,
- Zheng, L.**, White, R.H., Cash, V.L., Dean, D.R. (1994): Mechanism for the Desulfurization of L-Cysteine Catalysed by the *nifS* Gene Product. *Biochemistry* **33**, 4714-4720
- Zinoni F.**, Birkmann A, Stadtman TC, Bock A (1986): Nucleotide sequence and expression of the selenocysteine-containing polypeptide of formate dehydrogenase (formate-hydrogen-lyase-linked) from *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **83**:4650-4

ATT TTT CAG AGA TTA CCA GAG AGA CAG CGA GAA ACA TTT CTT TCG GCG																			M	E	A	F
11 20 29 38 47 56																			ATG	GAA	GCA	TTT
L	K	E	F	G	D	Y	Y	G	Y	P	D	G	P	K	N	I	Q	E	I	R	D	
CTT	AAG	GAA	TTC	GGA	GAT	TAT	TAT	GGA	TAC	CCA	GAT	GGT	CCC	AAG	AAC	ATT	CAA	GAG	ATC	CGC	GAC	
		71		80				89		98		107		116				125				
T	E	F	K	R	L	D	K	G	V	V	Y	L	D	H	A	G	S	T	L	Y	S	
ACC	GAA	TTC	AAG	AGA	TTA	GAT	AAA	GGT	GTT	GTA	TAC	TTG	GAT	CAT	GCT	GGT	TCT	ACT	TTG	TAT	TCT	
		137		146				155		164		173		182				191				
E	L	Q	M	E	Y	I	F	K	D	F	T	S	N	V	F	G	N	P	H	S	Q	
GAG	TTG	CAG	ATG	GAA	TAT	ATT	TTT	AAG	GAC	TTC	ACA	AGC	AAT	GTT	TTT	GGA	AAT	CCA	CAT	AGT	CAA	
		203		212				221		230		239		248				257				
S	D	I	S	S	A	T	S	D	L	I	A	D	A	R	H	Q	V	L	E	Y	F	
AGT	GAT	ATC	AGT	TCG	GCC	ACC	AGT	GAC	CTT	ATA	GCG	GAT	GCT	CGA	CAT	CAG	GTG	CTT	GAA	TAC	TTT	
		269		278				287		296		305		314				323				
N	A	S	P	E	D	Y	S	C	L	F	T	S	G	A	T	A	A	L	K	L	V	
AAT	GCA	TCT	CCT	GAA	GAT	TAC	AGT	TGC	TTA	TTC	ACC	TCC	GGA	GCC	ACA	GCA	GCG	CTG	AAG	CTT	GTC	
		335		344				353		362		371		380				389				
G	E	T	F	P	W	T	Q	D	S	N	F	L	Y	T	M	E	N	H	N	S	V	
GGA	GAG	ACT	TTT	CCG	TGG	ACC	CAA	GAC	AGT	AAT	TTT	TTG	TAT	ACC	ATG	GAG	AAT	CAC	AAC	AGT	GTA	
		401		410				419		428		437		446				455				
L	G	I	R	E	Y	A	L	A	Q	G	A	S	A	C	A	V	D	I	E	E	A	
CTT	GGT	ATT	AGG	GAA	TAT	GCA	TTA	GCT	CAA	GGT	GCT	TCA	GCA	TGT	GCA	GTG	GAT	ATT	GAA	GAG	GCA	
		467		476				485		494		503		512				521				
A	N	Q	P	G	Q	L	T	N	S	G	P	S	I	K	V	K	H	R	A	V	Q	
GCT	AAC	CAA	CCA	GGC	CAG	CTT	ACA	AAT	TCA	GGA	CCA	TCT	ATC	AAG	GTA	AAG	CAT	CGT	GCT	GTG	CAG	
		533		542				551		560		569		578				587				
M	R	N	T	S	K	L	Q	K	E	E	S	R	G	N	A	Y	N	L	F	A	F	
ATG	AGA	AAC	ACT	TCT	AAA	CTC	CAA	AAG	GAA	GAG	TCA	AGA	GGA	AAT	GCC	TAT	AAT	CTA	TTT	GCT	TTT	
		599		608				617		626		635		644				653				
P	S	E	C	N	F	S	G	L	R	F	N	L	D	L	V	K	L	M	K	E	N	
CCC	TCG	GAG	TGC	AAT	TTT	TCT	GGC	CTG	AGG	TTT	AAT	CTA	GAT	CTG	GTG	AAG	TTG	ATG	AAA	GAA	AAT	
		665		674				683		692		701		710				719				
T	E	T	V	L	Q	G	S	P	F	S	K	S	K	R	W	M	V	L	I	D	A	
ACT	GAG	ACC	GTG	CTA	CAA	GGC	TCC	CCC	TTT	AGC	AAG	AGC	AAG	CGG	TGG	ATG	GTG	TTG	ATT	GAT	GCT	
		731		740				749		758		767		776				785				
A	K	G	C	A	T	L	P	P	D	L	S	E	Y	P	A	D	F	V	V	L	S	
GCA	AAG	GGT	TGT	GCT	ACA	CTA	CCA	CCT	GAT	TTA	TCG	GAG	TAT	CCT	GCA	GAT	TTT	GTT	GTT	CTG	TCA	
		797		806				815		824		833		842				851				
F	Y	K	L	F	G	Y	P	T	G	L	G	A	L	L	V	R	N	D	A	A	K	
TTC	TAC	AAG	TTA	TTT	GGT	TAT	CCT	ACT	GGG	CTT	GGC	GCT	CTC	CTT	GTA	CGG	AAT	GAT	GCA	GCC	AAA	
		863		872				881		890		899		908				917				
L	L	K	K	T	Y	F	S	G	G	T	V	A	A	S	I	A	D	I	D	F	V	
TTG	CTC	AAA	AAG	ACT	TAT	TTT	AGT	GGA	GGC	ACT	GTT	GCT	GCT	TCA	ATT	GCT	GAC	ATC	GAC	TTT	GTA	
		929		938				947		956		965		974				983				
K	R	R	E	R	V	E	E	F	F	E	D	G	S	A	S	F	L	S	I	A	A	
AAA	AGA	AGG	GAA	AGG	GTG	GAG	GAG	TTT	TTT	GAG	GAT	GGT	TCT	GCT	TCA	TTC	CTG	AGC	ATA	GCA	GCC	
		995		1004				1013		1022		1031		1040				1049				
I	R	H	G	F	K	L	L	K	S	L	T	P	S	G	I	W	M	H	T	T	S	
ATC	CGT	CAT	GGC	TTC	AAA	TTA	CTC	AAG	TCG	CTT	ACA	CCT	TCT	ACA	ATT	TGG	ATG	CAC	ACA	ACG	TCA	
		1061		1070				1079		1088		1097		1106				1115				
L	S	I	Y	V	K	K	K	L	Q	A	L	R	H	G	N	G	A	A	V	C	V	
CTT	TCC	ATA	TAT	GTG	AAA	AAG	AAG	CTT	CAG	GCT	TTA	CGA	CAT	GGA	AAC	GGG	GCT	GCT	GTA	TGT	GTT	
		1127		1136				1145		1154		1163		1172				1181				
L	Y	G	S	E	N	L	E	L	S	S	H	K	S	G	P	T	V	T	F	N	L	
CTG	TAT	GGC	AGT	GAA	AAT	CTG	GAG	TTA	TCT	TCA	CAT	AAA	TCA	GGC	CCA	ACG	GTT	ACA	TTC	AAC	TTG	
		1193		1202				1211		1220		1229		1238				1247				



```

K   R   P   D   G   S   W   F   G   Y   L   E   V   E   K   L   A   S   L   S   G   I
AAA AGA CCT GAT GGC TCT TGG TTT GGC TAC TTG GAG GTG GAG AAG CTT GCT TCT TTA TCT GGA ATT
      1259           1268           1277           1286           1295           1304           1313

Q   L   R   T   G   C   F   C   N   P   G   A   C   A   K   Y   L   E   L   S   H   S
CAG TTA CGG ACA GGA TGT TTT TGC AAT CCT GGC GCA TGT GCA AAG TAT CTC GAG TTA TCC CAT TCT
      1325           1334           1343           1352           1361           1370           1379

E   L   R   S   N   V   E   A   G   H   I   C   W   D   D   N   D   V   I   N   G   K
GAG CTA CGG TCT AAT GTA GAG GCT GGC CAT ATT TGC TGG GAT GAC AAT GAT GTG ATA AAT GGA AAA
      1391           1400           1409           1418           1427           1436           1445

P   T   G   A   V   R   V   S   F   G   Y   M   S   T   F   E   D   A   K   K   F   I
CCA ACA GGG GCT GTT AGG GTT TCG TTT GGT TAT ATG TCA ACC TTT GAA GAT GCC AAG AAA TTT ATT
      1457           1466           1475           1484           1493           1502           1511

D   F   I   I   S   S   F   A   S   P   P   K   K   T   G   N   G   T   V
GAT TTC ATC ATA AGT TCA TTT GCT TCA CCT CCA AAG AAG ACT GGG AAT GGA ACC GTC TGA
      1523           1532           1541           1550           1559           1568

```

## I.2 *A. thaliana aba3-ct-cDNA*

basierend auf *A. thaliana aba3-cDNA* (GenBank Accession: AF325457)

```

      M   Q   L   P   S   E   D   L   E   S   K   E   S   F   P   S   H   Y   L   K
      ATG CAA CTT CCT AGT GAA GAC CTT GAA AGT AAA GAA TCT TTT CCA AGC CAC TAC CTT AAG
      1589           1598           1607           1616           1625           1634           1643

S   I   T   V   Y   P   I   K   S   C   A   G   F   S   V   I   R   W   P   L   C   R
TCA ATT ACT GTA TAC CCG ATC AAG TCA TGT GCT GGA TTT TCT GTG ATA CGT TGG CCA CTT TGC AGA
      1655           1664           1673           1682           1691           1700           1709

T   G   L   L   H   D   R   E   W   M   V   Q   G   L   T   G   E   I   L   T   Q   K
ACA GGC CTG CTG CAT GAT CGA GAA TGG ATG GTT CAG GGT CTG ACC GGT GAA ATT CTT ACC CAA AAG
      1721           1730           1739           1748           1757           1766           1775

K   V   P   E   M   S   L   I   K   T   F   I   D   L   E   E   G   L   L   S   V   E
AAG GTG CCT GAG ATG TCT CTT ATA AAA ACC TTT ATC GAC CTT GAG GAA GGA CTA CTG TCT GTA GAA
      1787           1796           1805           1814           1823           1832           1841

S   S   R   C   E   D   K   L   H   I   R   I   K   S   D   S   Y   N   P   R   N   D
TCT TCT CGC TGC GAA GAC AAG TTG CAC ATC AGA ATC AAG TCT GAT TCA TAT AAC CCG AGG AAC GAT
      1853           1862           1871           1880           1889           1898           1907

E   F   D   S   H   A   N   I   L   E   N   R   N   E   E   T   R   I   N   R   W   F
GAG TTT GAT TCA CAT GCC AAC ATA CTT GAA AAC CGT AAT GAG GAA ACT AGA ATC AAT CGT TGG TTC
      1919           1928           1937           1946           1955           1964           1973

T   N   A   I   G   R   Q   C   K   L   L   R   Y   S   S   S   T   S   K   D   C   L
ACC AAT GCC ATT GGT CGA CAA TGC AAG TTG CTA CGG TAT TCT AGC TCT ACT TCC AAA GAC TGC TTG
      1985           1994           2003           2012           2021           2030           2039

N   R   N   K   S   P   G   L   C   R   D   L   E   S   N   I   N   F   A   N   E   A
AAC AGA AAC AAG AGT CCT GGT TTG TGC AGA GAT TTG GAA AGC AAT ATC AAC TTT GCT AAT GAA GCT
      2051           2060           2069           2078           2087           2096           2105

Q   F   L   L   I   S   E   E   S   V   A   D   L   N   R   R   L   E   A   K   D   E
CAG TTC TTG TTA ATC TCC GAG GAG AGT GTT GCT GAC CTA AAC AGA AGA TTA GAA GCA AAA GAC GAG
      2117           2126           2135           2144           2153           2162           2171

D   Y   K   R   A   H   E   K   L   N   P   H   R   F   R   P   N   L   V   I   S   G
GAT TAC AAA CGG GCT CAT GAA AAA CTC AAT CCA CAT AGG TTC AGA CCA AAT CTG GTT ATA TCT GGA
      2183           2192           2201           2210           2219           2228           2237

G   E   P   Y   G   E   D   K   W   K   T   V   K   I   G   D   N   H   F   T   S   L
GGT GAA CCA TAC GGG GAA GAT AAA TGG AAA ACT GTC AAG ATA GGA GAC AAT CAT TTC ACA TCA TTG
      2249           2258           2267           2276           2285           2294           2303

G   G   C   N   R   C   Q   M   I   N   I   S   N   E   A   G   L   V   K   K   S   N
GGC GGT TGT AAC CGG TGC CAG ATG ATA AAC ATA AGT AAT GAA GCT GGA CTA GTG AAG AAA TCC AAT
      2315           2324           2333           2342           2351           2360           2369

E   P   L   T   T   L   A   S   Y   R   R   V   K   G   K   I   L   F   G   T   L   L
GAG CCC TTA ACA ACT TTA GCT TCA TAT AGG AGA GTA AAG GGA AAG ATC TTG TTT GGA ACG CTT TTG
      2381           2390           2399           2408           2417           2426           2435

R   Y   E   I   D   E   K   R   Q   C   W   I   G   V   G   E   E   V   N   P   D   I
AGA TAC GAG ATT GAT GAG AAA AGA CAA TGT TGG ATT GGA GTT GGG GAA GAA GTT AAT CCA GAT ATT
      2447           2456           2465           2474           2483           2492           2501

E
GAA TAA

```

## I.2 *H. sapiens hmcs-cDNA*

Länge der *H. sapiens hmcs-cDNA+ncds*: 2729 bp; aufgelistet von: 1 bis: 2729;

Übersetzt von: 22 bis: 2685 (Entire region);

```

Frame 1
          M  A  G  A  A  A  E  S  G  R  E
      CTG GAT GGA CTA GCC GGG GCC ATG GCC GGC GCG GCG GCG GAG TCA GGG CGG GAG
          9          18          27          36          45          54
L   W   T   F   A   G   S   R   D   P   S   A   P   R   L   A   Y   G   Y   G
CTG TGG ACC TTC GCG GGT TCC CGG GAC CCG AGC GCA CCG CGG CTA GCC TAC GGC TAC GGC
      63          72          81          90          99          108
P   G   S   L   R   E   L   R   A   R   E   F   S   R   L   A   G   T   V   Y
CCG GGC AGC CTG CGC GAG CTG CGG GCG CGC GAG TTC AGC CGC CTG GCA GGA ACT GTC TAT
      123          132          141          150          159          168
L   D   H   A   G   A   T   L   F   S   Q   S   Q   L   E   S   F   T   S   D
CTT GAC CAT GCA GGT GCC ACC TTG TTC TCC CAG AGC CAG CTC GAA AGC TTC ACT AGT GAT
      183          192          201          210          219          228
L   M   E   N   T   Y   G   N   P   H   S   Q   N   I   S   S   K   L   T   H
CTC ATG GAA AAC ACT TAT GGT AAT CCT CAC AGC CAG AAC ATC AGC AGC AAG CTC ACC CAT
      243          252          261          270          279          288
D   T   V   E   Q   V   R   Y   R   I   L   A   H   F   H   T   T   A   E   D
GAC ACT GTG GAG CAG GTG CGC TAC AGA ATC CTG GCG CAC TTC CAC ACC ACC GCA GAA GAC
      303          312          321          330          339          348
Y   T   V   I   F   T   A   G   S   T   A   A   L   K   L   V   A   E   A   F
TAC ACT GTG ATC TTC ACT GCC GGG AGC ACG GCT GCT CTC AAA CTG GTG GCA GAG GCC TTT
      363          372          381          390          399          408
P   W   V   S   Q   G   P   E   S   S   G   S   R   F   C   Y   L   T   D   S
CCA TGG GTG TCC CAG GGC CCA GAG AGC AGT GGG AGT CGC TTC TGT TAC CTC ACC GAC AGC
      423          432          441          450          459          468
H   T   S   V   V   G   M   R   N   V   T   M   A   I   N   V   I   S   I   P
CAC ACC TCC GTA GTG GGT ATG AGG AAC GTG ACC ATG GCT ATA AAT GTC ATA TCC ATC CCG
      483          492          501          510          519          528
V   R   P   E   D   L   W   S   A   E   E   R   G   A   S   A   S   N   P   D
GTC AGG CCA GAG GAC CTG TGG TCT GCA GAG GAA CGT GGT GCT TCA GCC AGC AAC CCA GAC
      543          552          561          570          579          588
C   Q   L   P   H   L   F   C   Y   P   A   Q   S   N   F   S   G   V   R   Y
TGC CAG CTG CCG CAT CTC TTC TGC TAC CCA GCT CAG AGT AAC TTT TCT GGA GTC AGA TAC
      603          612          621          630          639          648
P   L   S   W   I   E   E   V   K   S   G   R   L   R   P   V   S   T   P   G
CCC CTG TCC TGG ATA GAA GAG GTC AAG TCT GGG CGG TTG CGC CCT GTG AGC ACG CCT GGG
      663          672          681          690          699          708
K   W   F   V   L   L   D   A   A   S   Y   V   S   T   S   P   L   D   L   S
AAG TGG TTT GTG CTG CTG GAT GCA GCC TCC TAC GTG AGC ACC TCG CCT TTG GAC CTG TCA
      723          732          741          750          759          768
A   H   Q   A   D   F   V   P   I   S   F   Y   K   I   F   G   F   P   T   G
GCT CAC CAG GCC GAC TTT GTC CCC ATC TCC TTC TAT AAG ATC TTC GGG TTT CCT ACA GGC
      783          792          801          810          819          828
L   G   A   L   L   V   H   N   R   A   A   P   L   L   R   K   T   Y   F   G
CTG GGC GCT CTG CTG GTC CAT AAT CGT GCG GCT CCT CTA CTG AGG AAG ACC TAC TTT GGA
      843          852          861          870          879          888
G   G   T   A   S   A   Y   L   A   G   E   D   F   Y   I   P   R   Q   S   V

```

GGA GGG ACA GCC TCT GCG TAC CTA GCA GGA GAA GAC TTC TAC ATC CCG AGG CAG TCG GTA  
903 912 921 930 939 948  
A Q R F E D G T I S F L D V I A L K H G  
GCT CAG AGG TTT GAA GAT GGC ACC ATC TCA TTC CTT GAT GTT ATC GCG CTA AAA CAT GGA  
963 972 981 990 999 1008  
F D T L E R L T G G M E N I K Q H T F T  
TTT GAC ACC CTA GAG CGC CTC ACA GGT GGA ATG GAG AAT ATA AAG CAG CAC ACC TTC ACC  
1023 1032 1041 1050 1059 1068  
L A Q Y T Y M A L S S L Q Y P N G A P V  
TTG GCT CAG TAT ACC TAC ATG GCC CTG TCC TCT CTC CAG TAC CCC AAT GGA GCC CCT GTG  
1083 1092 1101 1110 1119 1128  
V R I Y S D S E F S S P E V Q G P I I N  
GTG CGG ATT TAC AGC GAT TCT GAG TTC AGC AGC CCT GAG GTT CAG GGC CCG ATC ATC AAT  
1143 1152 1161 1170 1179 1188  
F N V L D D K G N I I G Y S Q V D K M A  
TTT AAT GTG CTG GAT GAC AAA GGG AAC ATC ATT GGT TAC TCC CAG GTG GAC AAA ATG GCC  
1203 1212 1221 1230 1239 1248  
S L Y N I H L R T G C F C N T G A C Q R  
AGT CTT TAC AAC ATC CAC CTG CGA ACT GGC TGC TTC TGT AAC ACT GGG GCC TGC CAG AGG  
1263 1272 1281 1290 1299 1308  
H L G I S N E M V R K H F Q A G H V C G  
CAC CTG GGC ATA AGC AAC GAG ATG GTC AGG AAG CAT TTT CAG GCT GGT CAT GTC TGT GGG  
1323 1332 1341 1350 1359 1368  
D N M D L I D G Q P T G S V R I S F G Y  
GAC AAT ATG GAC CTC ATA GAT GGG CAG CCC ACA GGA TCT GTG AGG ATT TCA TTT GGA TAC  
1383 1392 1401 1410 1419 1428  
M S T L D D V Q A F L R F I I D T R L H  
ATG TCG ACG CTG GAT GAT GTC CAG GCC TTT CTT AGG TTC ATC ATA GAC ACT CGC CTG CAC  
1443 1452 1461 1470 1479 1488  
S S G D W P V P Q A H A D T G E T G A P  
TCA TCA GGG GAC TGG CCT GTC CCT CAG GCC CAT GCT GAC ACC GGG GAG ACT GGA GCC CCA  
1503 1512 1521 1530 1539 1548  
S A D S Q A D V I P A V M G R R S L S P  
TCA GCA GAC AGC CAG GCT GAT GTT ATA CCT GCT GTC ATG GGC AGA CGT AGC CTC TCG CCT  
1563 1572 1581 1590 1599 1608  
Q E D A L T G S R V W N N S S T V N A V  
CAG GAA GAT GCC CTC ACA GGC TCC AGG GTT TGG AAC AAC TCG TCT ACT GTG AAT GCT GTG  
1623 1632 1641 1650 1659 1668  
P V A P P V C D V A R T Q P T P S E K A  
CCT GTG GCC CCA CCT GTG TGT GAT GTC GCC AGA ACC CAG CCG ACT CCT TCA GAG AAA GCT  
1683 1692 1701 1710 1719 1728  
A G V L E G A L G P H V V T N L Y L Y P  
GCA GGA GTC CTG GAG GGG GCC CTT GGG CCA CAT GTT GTC ACT AAC CTT TAT CTC TAT CCA  
1743 1752 1761 1770 1779 1788  
I K S C A A F E V T R W P V G N Q G L L  
ATC AAA TCC TGT GCT GCA TTT GAG GTG ACC AGG TGG CCT GTA GGA AAC CAA GGG CTG CTA  
1803 1812 1821 1830 1839 1848  
Y D R S W M V V N H N G V C L S Q K Q E  
TAT GAC CGG AGC TGG ATG GTT GTG AAT CAC AAT GGT GTT TGC CTG AGT CAG AAG CAG GAA  
1863 1872 1881 1890 1899 1908  
P R L C L I Q P F I D L R Q R I M V I K  
CCC CGG CTC TGC CTG ATC CAG CCC TTC ATC GAC TTG CGG CAA AGG ATC ATG GTC ATC AAA  
1923 1932 1941 1950 1959 1968  
A K G M E P I E V P L E E N S E R T Q I

GCC AAA GGG ATG GAG CCT ATA GAG GTG CCT CTT GAG GAA AAT AGT GAA CGG ACT CAG ATT  
1983 1992 2001 2010 2019 2028  
R Q S R V C A D R V S T Y D C G E K I S  
CGC CAA AGC AGG GTC TGT GCT GAC AGA GTA AGT ACT TAT GAT TGT GGA GAA AAA ATT TCA  
2043 2052 2061 2070 2079 2088  
S W L S T F F G R P C N L I K Q S S N S  
AGC TGG TTG TCA ACA TTT TTT GGC CGT CCT TGT AAT TTG ATC AAA CAA AGT TCA AAC TCT  
2103 2112 2121 2130 2139 2148  
Q R N A K K K H G K D Q L P G T M A T L  
CAA AGG AAT GCA AAG AAG AAA CAT GGA AAA GAT CAA CTT CCT GGT ACA ATG GCC ACC CTT  
2163 2172 2181 2190 2199 2208  
S L V N E A Q Y L L I N T S S I L E L H  
TCT CTG GTG AAT GAG GCA CAG TAT CTG CTG ATC AAC ACA TCC AGT ATT TTG GAA CTT CAC  
2223 2232 2241 2250 2259 2268  
R Q L N T S D E N G K E E L F S L K D L  
CGG CAA CTA AAC ACC AGT GAT GAG AAT GGA AAG GAG GAA TTA TTC TCA CTG AAG GAT CTC  
2283 2292 2301 2310 2319 2328  
S L R F R A N I I I N G K R A F E E E K  
AGC TTG CGT TTT CGT GCC AAT ATT ATT ATC AAT GGA AAA AGG GCT TTT GAA GAA GAG AAA  
2343 2352 2361 2370 2379 2388  
W D E I S I G S L R F Q V L G P C H R C  
TGG GAT GAG ATT TCA ATT GGC TCT TTG CGT TTC CAG GTT TTG GGG CCT TGT CAC AGA TGC  
2403 2412 2421 2430 2439 2448  
Q M I C I D Q Q T G Q R N Q H V F Q K L  
CAG ATG ATT TGC ATC GAC CAG CAA ACT GGG CAA CGA AAC CAG CAT GTT TTC CAA AAA CTT  
2463 2472 2481 2490 2499 2508  
S E S R E T K V N F G M Y L M H A S L D  
TCT GAG AGT CGT GAA ACA AAG GTG AAC TTT GGC ATG TAC CTG ATG CAT GCA TCA TTG GAT  
2523 2532 2541 2550 2559 2568  
L S S P C F L S V G S Q V L P V L K E N  
TTA TCC TCC CCA TGT TTC CTG TCT GTA GGA TCT CAG GTG CTC CCT GTG TTG AAA GAG AAT  
2583 2592 2601 2610 2619 2628  
V E G H D L P A S E K H Q D V T S  
GTG GAA GGT CAT GAT TTA CCT GCA TCT GAG AAA CAC CAG GAT GTT ACC TCC TAA AAA AAA  
2643 2652 2661 2670 2679 2688  
  
TTT TTA GCA TAC ATT AAA GTT TCT CTT TTA CAG TG  
2703 2712 2721

## Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Ralf-R. Mendel, dessen Unterstützung und Hilfsbereitschaft mir vom Studium bis heute immer gewiß waren. Besonders zu erwähnen sind dabei die vielen Gelegenheiten, zu denen er es mir ermöglichte, an Tagungen teilzunehmen und schon frühzeitig Erfahrungen im Ausland zu sammeln. Nicht zuletzt danke ich ihm für die Betrauung mit einem hochinteressanten und vielseitigen Thema, welches es mir leicht gemacht hat, meine Begeisterung für die Forschung immer zu behalten.

Natürlich danke ich besonders Dr. Florian Bittner, dessen engagierte und geduldige Betreuung in Verbindung mit einem regen Informationsaustausch wesentlich zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen hat. Besonders zu danken habe ich ihm für die Freiräume, die er mir gelassen hat, um selbständig und kreativ neue Forschungsansätze zu verwirklichen. Nicht zuletzt danke ich ihm für eine menschlich ausgesprochen faire und freundschaftliche Atmosphäre.

Ebenso danke ich Prof. Dr. Tracy Palmer, die mich während meiner Forschung in Norwich in allen Belangen unterstützt hat, sowie Prof. Dr. Dennis R. Dean, der mir durch seine uneingeschränkte Unterstützung in Blacksburg einen unvergesslichen und erfolgreichen Forschungsaufenthalt ermöglichte.

Ich danke Silke Wollers und Julia Teschner für die Hilfsbereitschaft, der ich mir immer sicher sein konnte, für die tolle Zusammenarbeit und den kreativen Wissensaustausch. Darüberhinaus möchte ich meinen Diplomanden Sonja Horatzek und Steffen Rump für die kreative und erfolgreiche Zusammenarbeit danken. Natürlich danke ich auch allen anderen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Mendel für das freundliche und von Teamgeist geprägte Arbeitsklima. So ist es mir wichtig zu sagen, dass ich während dieser Zeit nicht nur Kollegen kennengelernt, sondern auch Freunde gefunden habe.

Selbstverständlich danke ich besonders meinen Eltern für deren andauernde, liebevolle und grenzenlose Unterstützung, die mir jederzeit sicher war und die vieles überhaupt erst möglich gemacht hat.

Ich danke der wichtigsten Person in meinem Leben, meiner Freundin Madeleine Peschke, mit der ich das große Glück habe, dass sie mich nicht nur menschlich ergänzt und immer unterstützt, sondern mir auch in der wichtigsten Phase meiner Promotion eine unverzichtbare und aufopferungsvolle Hilfe bei der Arbeit war.

## **L e b e n s l a u f**

### **Persönliche Daten:**

Name: Torsten Heidenreich  
Geburtsdatum: 09. Oktober 1976  
Geburtsort: Celle  
Staatsangehörigkeit: deutsch  
Familienstand: ledig

### **Schulausbildung:**

1983 - Juni 1989 Grundschole/Orientierungsstufe Klein Hehlen, Celle  
Aug. 1989 - Mai 1996 Hölty Gymnasium, Celle  
22. Mai 1996 Erhalt der allgemeinen Hochschulreife

### **Zivildienst:**

Aug. 1996 - Aug. 1997 Zivildienst bei den Johannitern in Celle

### **Studium:**

Okt. 1997 - Sept. 1999 Grundstudium der Biologie an der TU-Braunschweig  
Vordiplom am 21. September 1999  
Okt. 1999 - Mai 2003 Hauptstudium der Biologie an der TU-Braunschweig  
Juni 2002 - Mai 2003 Diplomarbeit am Institut für Pflanzenbiologie der TU-Braunschweig mit dem Thema: „Biochemische Charakterisierung der NifS-homologen Domäne der Molybdäncofaktor-Sulfurase ABA3 aus *Arabidopsis thaliana*“  
21 Mai 2003 Abschluß zum Diplom-Biologen

### **Berufliche Tätigkeit:**

Juni 2003 - Dez. 2006 Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Pflanzenbiologie der TU-Braunschweig und Promotion mit dem Thema „Identifizierung und Charakterisierung der NH<sub>2</sub>-terminalen Domäne der Molybdäncofaktor-Sulfurase ABA3 aus *Arabidopsis thaliana* als Pyridoxalphosphat-abhängige L-Cystein-Desulfurase“